

【特許請求の範囲】

【請求項1】 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの1, 3-プロパンジオールへの転換のための非-特異的触媒活性をコードし、且つ：

(a) 配列番号：57のアミノ酸配列のすべて又は実質的部分をコードする単離された核酸フラグメント；

(e) 配列番号：57のアミノ酸配列のすべて又は実質的部分をコードする単離された核酸フラグメントに実質的に類似している単離された核酸フラグメント；

(f) 配列番号：57のアミノ酸配列の少なくとも80%を有する少なくとも387個のアミノ酸のポリペプチドをコードする単離された核酸フラグメント；

(d) 0.1XSSC、0.1%SDS、65℃のハイブリダイゼーション条件下で(a)とハイブリダイゼーションし、2XSSC、0.1%SDS及び続いて0.1XSSC、0.1%SDSを用いて洗浄された単離された核酸フラグメント；ならびに

(e) (a)、(b)、(c)又は(d)に相補的である単離された核酸フラグメント

より成る群から選ばれる単離された核酸フラグメント。

【請求項2】 配列番号：58に示される単離された核酸フラグメント。

【請求項3】 請求項1の単離された核酸フラグメントによりコードされるポリペプチド。

【請求項4】 配列番号：57に示される請求項3のポリペプチド。

【請求項5】 適した調節配列に操作可能に結合した請求項1の単離された核酸フラグメントを含むキメラ遺伝子。

【請求項6】 請求項5のキメラ遺伝子を用いて形質転換された、シトロバクテル (*Cytrobacter*)、エンテロバクテル (*Enterobacter*)、クロスツリジウム (*Clostridium*)、クレブシエラ (*Klebsiella*)、アエロバクテル (*Aerobacter*)、ラクトバシルス (*Lactobacillus*)、アスペルギルス (*Aspergillus*)、サッカロミセス (*Saccharomyces*)、シゾサッカロミセス (*Sc*

hizosaccharomyces)、チゴサッカロミセス(Zygosaccharomyces)、ピチア(Pichia)、クルイベロミセス(Kluyveromyces)、カンジダ(Candida)、ハンセヌラ(Hansenula)、デバリオミセス(Debaryomyces)、ムコル(Mucor)、トルロプシス(Torulopsis)、メチロバクテル(Methylobacter)、サルモネラ(Salmonella)、バシルス(Bacillus)、アエロバクテル(Aerobacter)、ストレプトミセス(Streptomyces)及びシュードモナス(Pseudomonas)より成る群から選ばれる微生物。

【請求項7】 (a) デヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子；

(b) デヒドラターゼ再活性化因子をコードする少なくとも1つの遺伝子；
及び

(c) 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを1, 3-プロパンジオールに転換する非-特異的触媒活性をコードする少なくとも1つの外因性遺伝子を含む1, 3-プロパンジオールの生産に有用な組換え微生物であって、1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ活性をコードする機能性dhaT遺伝子が組換え微生物中に存在せず、微生物がシトロバクテル、エンテロバクテル、クロスツリジウム、クレブシエラ、アエロバクテル、ラクトバシルス、アスペルギルス、サッカロミセス、シゾサッカロミセス、チゴサッカロミセス、ピチア、クルイベロミセス、カンジダ、ハンセヌラ、デバリオミセス、ムコル、トルロプシス、メチロバクテル、サルモネラ、バシルス、アエロバクテル、ストレプトミセス及びシュードモナスより成る群から選ばれる組換え微生物。

【請求項8】 さらに：

(a) グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子；及び

(b) グリセロール-3-ホスファターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子
を含む請求項7の組換え微生物。

【請求項9】 デヒドラターゼ再活性化因子がd h aレギュロンから単離されるo r f X及びo r f Zによりコードされる請求項7又は8の組換え微生物。

【請求項10】 o r f X及びo r f Zが独立にクレブシエラ種、シトロバクテル種又はクロスツリジウム種から単離される請求項9の組換え微生物。

【請求項11】 さらに、それぞれが遺伝子を不活性化する突然変異を有する1組の内因性遺伝子を含み、該組が：

(a) グリセロールキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする第1の遺伝子；

(b) グリセロールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする第2の遺伝子；及び

(c) トリオースリン酸イソメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする第3の遺伝子

から成る請求項8の組換え微生物。

【請求項12】 組換え微生物が単糖類、オリゴ糖類、多糖類及び1-炭素(s i n g l e - c a r b o n) 基質より成る群から選ばれる炭素源を1, 3-プロパンジオールに転換する請求項8又は11の組換え微生物。

【請求項13】 組換え微生物がグリセロール及びジヒドロキシアセトンより成る群から選ばれる炭素源を1, 3-プロパンジオールに転換する請求項7の組換え微生物。

【請求項14】 グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子がG P D 1、G P D 2、G P D 3、D A R 1、g p s A、G U T 2、g l p D及びg l p A B Cより成る群から選ばれる請求項8又は11の組換え微生物。

【請求項15】 グリセロール-3-ホスファターゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子がG P P 1及びG P P 2より成る群から選ばれる請求項8又は11の組換え微生物。

【請求項16】 デヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子がグリセロールデヒドラターゼ及びジオールデヒドラターゼより成る群から選ばれる請求項7、8又は11の組換え微生物。

【請求項17】 デヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子がクレブシエラ種、シトロバクテル種又はクロスツリジウム種から単離される請求項7、8及び11の組換え微生物。

【請求項18】 (a) (i) デヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子；

(i i) グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子；

(i i i) グリセロール-3-ホスファターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子；及び

(i v) デヒドラターゼ再活性化因子をコードする少なくとも1つの遺伝子

より成る1組の外因性遺伝子；ならびに

(b) 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを1, 3-プロパンジオールに転換する非-特異的触媒活性をコードする少なくとも1つの内因性遺伝子を含む組換えE. コリ (E. coli) であって、組換えE. コリ中には1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ活性をコードする機能性dhaT遺伝子が存在しない組換えE. コリ。

【請求項19】 (a) (i) グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子；

(i i) グリセロール-3-ホスファターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子；及び

(i i i) dhaR、orfY、orfX、orfW、dhaB1、dhaB2、dhaB3及びorfZの遺伝子産物をコードする少なくとも1つの遺伝子のサブセット

より成る1組の外因性遺伝子、ならびに

(b) 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを1, 3-プロパンジオールに転換する非-特異的触媒活性をコードする少なくとも1つの内因性遺伝子を含む組換えE. コリであって、組換えE. コリ中には1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ活性をコードする機能性dhaT遺伝子が存在しない組

換えE. コリ。

【請求項20】 さらに、各遺伝子が遺伝子を不活性化する突然変異を有する1組の内因性遺伝子を含み、該組が：

(a) グリセロールキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子；

(b) グリセロールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子；及び

(c) トリオースリン酸イソメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子

から成る請求項19の組換えE. コリ。

【請求項21】 (a) 適した条件下で請求項19又は請求項20の組換えE. コリを単糖類、オリゴ糖類、多糖類及び1-炭素基質より成る群から選ばれる少なくとも1つの炭素源と接触させ、それにより1, 3-プロパンジオールを生産し；

(b) (a) で生産される1, 3-プロパンジオールを場合により回収することを含む1, 3-プロパンジオールの生物的生産のための方法。

【請求項22】 (a) 請求項19又は20の組換えE. コリあるいはさらに：

(i) デヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの外因性遺伝子；

(ii) デヒドラターゼ再活性化因子をコードする少なくとも1つの外因性遺伝子；

(iii) 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを1, 3-プロパンジオールに転換する非-特異的触媒活性をコードする少なくとも1つの内因性遺伝子を含む請求項19又は20の組換えE. コリを、グリセロール及びジヒドロキシアセトンより成る群から選ばれる少なくとも1つの炭素源と接触させ、

(b) (a) で生産される1, 3-プロパンジオールを場合により回収することを含む1, 3-プロパンジオールの生物的生産のための方法。

【請求項23】 (a) 組換えE. コリを第1の炭素源及び第2の炭素源と接触させ、組換えE. コリは：

(i) デヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの外因性遺伝子；

(i i) デヒドラターゼ再活性化因子をコードする少なくとも1つの外因性遺伝子；

(i i i) 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを1, 3-プロパンジオールに転換するのに十分な非-特異的触媒活性をコードする少なくとも1つの内因性遺伝子

を含み、ここで組換えE. コリ中に1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ活性をコードする機能性d h a T遺伝子は存在せず、且つここで第1の炭素源はグリセロール及びジヒドロキシアセトンより成る群から選ばれ、第2の炭素源は単糖類、オリゴ糖類、多糖類及び1-炭素基質より成る群から選ばれ；

(b) (a) で生産される1, 3-プロパンジオールを場合により回収することを含む1, 3-プロパンジオールの生産法。

【請求項24】 組換えE. コリがさらに

(a) (i) グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子；

(i i) グリセロール-3-ホスファターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子；及び

(i i i) d h a R、o r f Y、o r f X、o r f W、d h a B 1、d h a B 2、d h a B 3及びo r f Zの遺伝子産物をコードする少なくとも1つの遺伝子のサブセット

より成る1組の外因性遺伝子、ならびに

(b) 各遺伝子が遺伝子を不活性化する突然変異を有し；

(i) グリセロールキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子；

(i i) グリセロールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子；及び

(I I I) トリオースリン酸イソメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子

より成る1組の内因性遺伝子
を含む請求項23の方法。

【請求項25】 配列番号：1に示す1組の遺伝子dhaR、orfY、dhaT、orfX、orfW、dhaB1、dhaB2、dhaB3及びorfZを含むベクターpDT29。

【請求項26】 配列番号：1に示すdhaR、orfY、orfX、orfW、dhaB1、dhaB2、dhaB3及びorfZを含むベクターpKP32。

【請求項27】 (a) 各遺伝子が遺伝子を不活性化する突然変異を有し：

(i) グリセロールキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子；及び

(ii) グリセロールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子

より成る2つの内因性遺伝子の1組；

(b) グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの外因性遺伝子；

(c) グリセロール-3-ホスファターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの外因性遺伝子；ならびに

(d) プラスミドpKP32

を含む組換えE. コリ株KLP23。

【請求項28】 (a) 各遺伝子が遺伝子を不活性化する突然変異を有し：

(i) グリセロールキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子；

(ii) グリセロールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子；及び

(iii) トリオースリン酸イソメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子

より成る3つの内因性遺伝子の組
を含む組換えE. コリ株RJ8。

【請求項29】 (a) 適した条件下に、d h a レギュロンを含み、且つ1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ活性をコードする機能性 d h a T 遺伝子が欠けている組換え E. コリを少なくとも1つの炭素源と接触させ、ここで炭素源は単糖類、オリゴ糖類、多糖類及び1-炭素基質より成る群から選ばれ；

(b) (a) で生産される1, 3-プロパンジオールを場合により回収することを含む1, 3-プロパンジオールの生産法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の分野】**

本発明は、1つの微生物による発酵可能な炭素源の1, 3-プロパンジオールへの生物的転換 (biocconversion) 法を含む。

【0002】**【背景】**

1, 3-プロパンジオールは、ポリエステル繊維の生産ならびにポリウレタン及び環状化合物の製造において利用性を有する可能性のあるモノマーである。

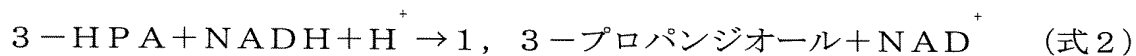
【0003】

1, 3-プロパンジオールへの多様な化学的経路が既知である。例えば触媒上でホスフィン、水、一酸化炭素、水素及び酸の存在下に、エチレンオキシドを1, 3-プロパンジオールに転換することができるか、アクロレインの接触液相水和及び続く還元によるか、あるいはグリセロールのような化合物から一酸化炭素及び水素の存在下に、周期表の第VII族の原子を有する触媒上で反応させることができる。これらの方法により1, 3-プロパンジオールを作ることは可能であるが、それらは高価であり、且つ環境汚染物を含有する廃流を生ぜしめる。

【0004】

グリセロールの発酵から1, 3-プロパンジオールを生産できることは、1世紀を越える以前から既知であった。例えばシトロバクテル (*Cytr obacter*)、クロストリジウム (*Clostridium*)、エンテロバクテル (*Enterobacter*)、イリオバクテル (*Ilyobacter*)、クレブシエラ (*Klebsiella*)、ラクトバシルス (*Lactobacillus*) 及びペロバクテル (*Pelobacter*) の群において、1, 3-プロパンジオールを生産できるバクテリア株が見いだされた。研究されたそれぞれの場合に、グリセロールは2段階の酵素触媒反応系列で1, 3-プロパンジオールに転換される。第1段階において、デヒドラターゼが3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド (3-HPA) 及び水へのグリセロールの転換、式1を触媒する。第2段階において、3-HPAがNAD⁺-結合オキシドレダクターゼにより1, 3

ープロパンジオールに還元される、式2。1, 3-プロパンジオールはそれ以上代謝されず、結果として



媒体中に堆積する。全体的反応は1還元当量 (a reducing equivalent) を補因子、還元されたβ-ニコチンアミドアデニンジヌクレオシド (NADH) の形態で消費し、それはニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD⁺) に酸化される。

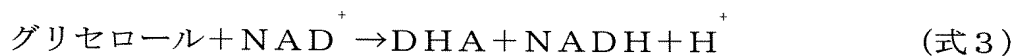
【0005】

クレブシエラ・ニューモニア (*Klebsiella pneumonia*)、シトロバクテル・フレウンジイ (*Citrobacter freundii*) 及びクロストリジウム・パステウリアヌム (*Clostridium pasteurianum*) においては、グリセロールデヒドラターゼの3つの構造サブユニットをコードする遺伝子 (dhaB1-3又はdhaB、C及びE) が特異的1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子 (dhaT) に隣接して位置している (図1を参照されたい)。これらの微生物の間で遺伝子編成 (genetic organization) はいくらか異なるが、これらの遺伝子は、orfX及びorfZ (グリセロールデヒドラターゼのためのデヒドラターゼ再活性化因子をコードする遺伝子) ならびにorfY及びorfW (未知の機能の遺伝子) も含む1つの群に集まっている。これらの微生物の特異的1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ (dhaT's) はI I I型アルコールデヒドロゲナーゼの群に属することが知られており；それぞれ保存されている鉄-結合モチーフを示し、且つ1, 3-プロパンジオール及び3-HPAのNAD⁺/NADH結合相互転換に関する優先性を有する。しかしながら、1, 3-プロパンジオール及び3-HPAのNAD⁺/NADH結合相互転換は、効率の低い速度論的パラメーターとはいえ、デヒドラターゼ酵素に特異的に結合しないアルコールデヒドロゲナーゼによっても触媒される (例えばウマ肝臓及びパン酵母アルコールデヒドロゲナーゼ (E. C. 1. 1. 1. 1))。グリセロールデヒドラターゼ (E. C. 4. 2. 1. 30) 及びジオール [1,

2-プロパンジオール] デヒドラターゼ (E. C. 4. 2. 1. 28) は関連しているが異なる酵素であり、それらは異なる遺伝子によりコードされる。クレブシエラ・オキシトカ (*Klebsiella oxytoca*) 及びサルモネラ・チフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) からのジオールデヒドラターゼ遺伝子はグリセロールデヒドラターゼ遺伝子に似ており、*orf X* 及び *orf Z* に類似の遺伝子を含む1つの群に集まっている (Daniel et al., FEMS Microbiol. Rev. 22, 553 (1999); Toraya and Mori, J. Biol. Chem. 274, 3372 (1999); GenBank AF026270)。

【0006】

グリセロールからの1, 3-プロパンジオールの生産は一般に嫌気性条件下でグリセロールを単独の炭素源として用いて、且つ他の外因性還元当量受容物質の不在下で行われる。これらの条件下で、例えばシトロバクテル、クロスツリジウム及びクレブシエラの株においては、最初に NAD^+ (もしくは NADP^+) 結合グリセロールデヒドロゲナーゼによるグリセロールのジヒドロキシアセトン (DHA) への酸化、式3を含むグリセロールに関する平行経路が働く。DHAは、DHAキナーゼによるジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) へのリン酸化 (式4) に続き、



生合成及び例えば解糖を介するATP生成の支持のために利用可能になる。1, 3-プロパンジオール経路と対照的に、この経路は細胞に炭素及びエネルギーを与えることができ、NADHを消費するのではなく生産する。

【0007】

クレブシエラ・ニューモニアエ (*Klebsiella pneumoniae*) 及びシトロバクテル・フレウンジイの場合、グリセロールデヒドラターゼ (*dhaB*)、1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ (*dhaT*)、グリセロールデヒドロゲナーゼ (*dhaD*) 及びジヒドロキシアセトンキナーゼ (*dhaK*) の機能的に結合した活性をコードする遺伝子は*dha* レギュロンによ

り包含されている。d h a レギュロンは、クレブシエラ・ニューモニアエ及びシトロバクテル・フレウンジイの場合、転写アクチベータタンパク質をコードする遺伝子 (d h a R) も包含している。シトロバクテル及びクレブシエラからの d h a レギュロンはエシェリキア・コリ (*E s c h e r i c h i a c o l i*) において発現され、グリセロールを 1, 3-プロパンジオールに転換することが示された。

【0008】

1, 3-プロパンジオールの生産のための上記で記載した化学的方法も生物的方法も、工業的規模の生産には十分に適しておらず、それは化学的方法はエネルギー集約的であり、生物的方法は高価な出発材料であるグリセロールからの比較的低い力価に限られるからである。これらの欠点は、低いエネルギー投入及び炭水化物又は糖類のような安価な出発材料を必要とする方法を用いて、あるいはグリセロール法の代謝効率を向上させることにより、克服され得た。いずれの方法の開発も、グリセロールへの糖類の、及び 1, 3-プロパンジオールへのグリセロールの転換を担う遺伝子機構 (g e n e t i c m a c h i n e r y) を操作する能力を必要とするであろう。

【0009】

グリセロールの生産のための生物的方法は既知である。圧倒的大多数のグリセロール生産物質は酵母であるが、いくつかのバクテリア、他の菌・カビ及び藻類も既知である。バクテリア及び酵母の両方はグルコース又は他の炭水化物を解糖又は E m b d e n M e y e r h o f P a r n a s 経路におけるフルクトース-1, 6-二リン酸経路を介して転換することによってグリセロールを生産するが、ある種の藻類は葉緑体中に溶解した二酸化炭素又は重炭酸塩をカルビンサイクルの 3-炭素中間体に転換する。1 系列の段階において、3-炭素中間体であるホスホグリセルリン酸はグリセルアルデヒド 3-リン酸に転換され、それはそのケト異性体であるジヒドロキシアセトンリン酸、そして究極的にはグリセロールに容易に相互転換され得る。

【0010】

特定のにはバクテリア、バシルス・リチエニホルミス (*B a c i l l u s l*

icheniiformis) 及びラクトバシルス・リコペルシカ (*Lactobacillus lycopersica*) がグリセロールを合成し、耐塩性藻類ドウナリエラ種 (*Dunaliella* sp.) 及びアステロモナス・グラシリス (*Asteromonas gracilis*) において、高い外部塩濃度に対する保護のためにグリセロール生産が見いだされる。同様に、種々の耐浸透圧性 (osmotolerant) 酵母が保護手段としてグリセロールを合成する。サッカロミセスのほとんどの株はアルコール発酵の間にいくらかのグリセロールを生産し、浸透圧ストレスの適用によりこれを生理学的に増加させることができる。本世紀初期に、亜硫酸塩もしくはアルカリのような「ステアリング試薬 (steering reagents)」が加えられたサッカロミセス培養の使用により商業的グリセロール生産が達成された。不活性な錯体の生成を介して、ステアリング試薬はエタノールへのアセトアルデヒドの転換を遮断もしくは阻害し；かくして過剰の還元当量 (NADH) がグリセロールを生産するための還元を利用され得るか、又はそのためにDHAPに向かって「ステアリングされる」。この方法は亜硫酸塩の故である酵母成長の部分的阻害により制限される。種々の機構により過剰のNADH当量を生ぜしめるアルカリの使用により、この制限を部分的に克服することができる。この実施の場合、アルカリはカニッツァロ不均化を開始させて2当量のアセトアルデヒドからエタノールと酢酸を与える。

【0011】

グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子 (DAR1、GPD1) が *S. ジアスタチクス* (*S. diastaticus*) からクローニングされ、配列決定された (Wang et al., J. Bact. 176, 7091-7095 (1994))。DAR1 遺伝子はシャトルベクター中にクローニングされ、*E. コリ* を形質転換するために用いられ、そこで発現は活性な酵素を生産した。Wang et al. (同上) は DAR1 が細胞の浸透圧環境 (osmotic environment) により調節されることを認識したが、組換え微生物における 1, 3-プロパンジオール生産を増強するためにどのように遺伝子を用い得るかを示唆してはいない。

【0012】

他のグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ酵素が単離された：例えば *sn*-グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼがサッカロミセス・セレビシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) からクローニングされ、且つ配列決定され (Larason et al., Mol. Microbiol. 10, 1101 (1993))、Albertyn et al. (Mol. Cell. Biol. 14, 4135 (1994)) はサッカロミセス・セレビシアエからのグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする GPD1 のクローニングを記載している。Wang et al. (同上) と同様に、Albertyn et al. 及び Larason et al. の両方はこの遺伝子の調節の浸透圧-感受性を認識しているが、組換え微生物中での 1, 3-プロパンジオールの生産においてどのように遺伝子を用い得るかを示唆してはいない。

【0013】

G3PDH の場合と同様に、グリセロール-3-ホスファターゼがサッカロミセス・セレビシアエから単離され、該タンパク質が GPP1 及び GPP2 遺伝子によりコードされることが同定された (Norbeck et al., J. Biol. Chem. 271, 13875 (1996))。G3PDH をコードする遺伝子と同様に、GPP2 は浸透圧感受性 (osmosensitive) であると思われる。

【0014】

グリセロール又はジヒドロキシアセトン以外の発酵可能な炭素源の 1, 3-プロパンジオールへの 1 微生物転換 (single microorganism conversion) は望ましいが、そのような試みには克服されるべきかなりの困難があることが実証されている。例えば Gottschalk et al (EP 373 230) は、シトロバクテル・フレウンジイ、クロスツリジウム・アウトブチリウム (*Clostridium autobutylicum*)、クロスツリジウム・ブチリウム (*Clostridium butylicum*) 及びクレブシエラ・ニューモニアエを含む 1, 3-プロパンジオール

の生産に有用なほとんどの株の成長がフルクトース又はグルコースのような水素供与体の存在により攪乱されると記載している。グリセロールとフルクトース又はグルコースの共一発酵において1, 3-プロパンジオールを生産するラクトバシルス・ブレビス (*Lactobacillus brevis*) 及びラクトバシルス・ブクネル (*Lactobacillus buchneri*) の株は、グリセロールが唯一の炭素源として与えられると成長せず、休止細胞はグルコース又はフルクトースを代謝できることが示されているが、それらは1, 3-プロパンジオールを生産しない (Veiga DA Cunha et al., J. Bacteriol., 174, 1013 (1992))。同様に、グリセロール及びアセテートが与えられると1, 3-プロパンジオールを生産するイリオバクテル・ポリトロプス (*Ilyobacter polytropus*) の株は、フルクトース及びグルコースを含むグリセロール以外の炭素基質から1, 3-プロパンジオールを生産しないであろうことが示されている (Steib et al., Arch. Microbiol. 140, 139 (1984))。最後に、Tong et al. (Appl. Biochem. Biotech. 34, 149 (1992)) は、グリセロールデヒドラターゼをコードするdhレギュロンを用いて形質転換された組換えエシェリキア・コリが外因性グリセロールの不在下でグルコース又はキシロースから1, 3-プロパンジオールを生産しないことを記載した。

【0015】

グリセロールからの1, 3-プロパンジオールの収率を向上させる試みが報告されており、その試みでは還元当量を与えることができる共一基質、典型的には発酵可能な糖類がプロセス中に含まれる。グリセロール及びグルコースを共一発酵させるシトロバクテル・フレウンジイ及びクレブシエラ・ニューモニアエ DSM 4270の休止細胞に関する収率における向上が特許請求されている (Gottschalk et al., 同上; ならびに Tran-Dinh et al., DE 3734 764); しかしグリセロール及びグルコースを共一発酵させるクレブシエラ・ニューモニアエ ATCC 25955の成長細胞に関しては特許請求されておらず、それは1, 3-プロパンジオールを生産しな

かった (I-T. Tong, Ph. D. Thesis, University of Wisconsin-Madison (1992))。組換えエシエリキア・コリによるグリセロールとグルコース又はフルクトースの共発酵に関する収率の向上が報告されている；しかしながらグリセロールの不在下で1, 3-プロパンジオールは生産されない (Tong et al., 同上)。これらの系においては、1つの微生物が細胞保持又は成長のためのエネルギー及び炭素を与えながらNADH生成の源として炭水化物を用いている。これらの開示は、糖類が1, 3-プロパンジオールを生産する炭素の流れに入らないことを示唆している。

【0016】

しかしながら最近、デヒドラターゼ酵素を発現する1つの微生物によるグリセロール又はジヒドロキシアセトン以外の炭素基質の1, 3-プロパンジオールへの転換が記載された (U. S. 5, 686, 276; WO 9821339; WO 9928480; 及びWO 9821341 (US 6013494))。グリセロール又はグルコースのいずれかからの1, 3-プロパンジオールの生産に導く生物的プロセスにおける特別な欠点は、発酵を介して達成される生産物の低い力価であった；かくして水性発酵ブイヨンから1, 3-プロパンジオールを得るためのエネルギー集約的な分離プロセスが必要である。1, 3-プロパンジオールへのグリセロールのフェドバッチ (fed batch) 又はバッチ発酵はクロスツリジウム・ブチリクムにより65 g/L (Saint-Amans et al., Biotechnology Letters 16, 831 (1994))、クロスツリジウム・ブチリクム突然変異株により71 g/L (Abbad-Andalousi et al., Appl. Environ. Microbiol. 61, 4413 (1995))、クレブシエラ・ニューモニアエにより61 g/L (Homann et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 33, 121 (1990)) 及びシトロバクテル・フレウンジイにより35 g/L (Homann et al., 同上) の最終的力価に導いた。グリセロール発酵から得られる力価を越えるグルコースの1, 3-プロパンジオールへの発酵はまだ開示されたことがない。

【0017】

解決されるべく残っている問題は、グルコース又は他の糖類のような安価な炭素基質から高い力価で、且つ1つの微生物によって1, 3-プロパンジオールを生物的に生産するやり方である。1, 3-プロパンジオールの生物的生产は2-段階連続反応のための基質としてグリセロールを必要とし、その反応ではデヒドラターゼ酵素（典型的には補酵素B₁₂-依存性デヒドラターゼ）がグリセロールを中間体である3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドに転換し、それが次いでNADH-（もしくはNADPH）依存性オキシドレダクターゼにより1, 3-プロパンジオールに還元される。補因子が必要であることの複雑さは、1, 3-プロパンジオールの生産のためにこの反応系列を使用する工業的プロセスのために全細胞触媒の使用を必要とする。

【0018】

【発明の概略】

出願人等は上記の問題を解決し、本発明は以前に得られたより有意に高い力価における、且つ1つの微生物の使用での発酵可能な炭素源の1, 3-プロパンジオールへの直接の生物的転換を提供する。モデル基質としてグルコースを用い、モデル宿主としてE. コリ (E. coli) を用いる。本発明の1つの側面において、1群の遺伝子（デヒドラターゼ活性、デヒドラターゼ再活性化因子、1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ (dhaT)、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ及びグリセロール-3-ホスファターゼをコードする遺伝子を含む）を発現する組換えE. コリがグリセロールから1, 3-プロパンジオールへの発酵の力価に近い力価でグルコースを1, 3-プロパンジオールに転換する。

【0019】

本発明の他の側面において、この組換えE. コリ中の機能性dhaT遺伝子の除去が、グルコースからの1, 3-プロパンジオールの有意により高い力価を生ずる。この予測されなかった力価における増加は経済性の向上及びかくしてグルコースからの1, 3-プロパンジオールの生産のための改良法を生ずる。

【0020】

さらに本発明は、1) グリセロール、2) ジヒドロキシアセトン、3) グリセロールの酸化状態におけるC₃化合物（例えばグリセロール3-リン酸）あるいは4) ジヒドロキシアセトンの酸化状態におけるC₃化合物（例えばジヒドロキシアセトンリン酸又はグリセルアルデヒド3-リン酸）に容易に転換されるいずれの炭素基質をも含むように一般的に応用され得る。d h a Tマイナス株における1, 3-プロパンジオールの生産は、3-HPAを1, 3-プロパンジオールに転換する非-特異的触媒活性を必要とする。3-HPAを1, 3-プロパンジオールに転換する非-特異的触媒活性を担う単数もしくは複数の酵素及び／又は単数もしくは複数の遺伝子の同定は、広範囲の炭素-含有基質からの基質を用いる広範囲の宿主微生物における1, 3-プロパンジオールの生産に導くであろう。3-HPAを1, 3-プロパンジオールに転換するこの非-特異的触媒活性の使用が、増加する力価及び得られる向上した経済性のおかげで、グリセロール又はジヒドロキシアセトンからの1, 3-プロパンジオールの生産のための改良法に導くであろうことも予測される。

【0021】

この活性は、配列番号：58に示される、あるいは：

(a) 配列番号：57のアミノ酸配列のすべて又は実質的部分をコードする単離された核酸フラグメント；

(b) 配列番号：57のアミノ酸配列のすべて又は実質的部分をコードする単離された核酸フラグメントに実質的に類似している単離された核酸フラグメント；

(c) 配列番号：57のアミノ酸配列の少なくとも80% (a t l e a s t 80% w i t h) を有する少なくとも387個のアミノ酸のポリペプチドをコードする単離された核酸フラグメント；

(d) 0.1XSSC、0.1%SDS、65℃のハイブリダイゼーション条件下で(a)とハイブリダイゼーションし、2XSSC、0.1%SDS、及び続いて0.1XSSC、0.1%SDSを用いて洗浄された単離された核酸フラグメント；ならびに

(d) (a)、(b)、(c)又は(d)に相補的である単離された核酸フラ

グ

メント

より成る群から選ばれる、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの1, 3-プロパンジオールへの転換のための非-特異的触媒活性をコードする核酸フラグメントとしてE. コリから単離された。あるいはまた、非特異的触媒活性は配列番号：57に示されるポリペプチドにおいて具体化される。

【0022】

適した調節配列に操作可能に結合された上記の単離された核酸フラグメントを含むキメラ遺伝子を構築することができる。このキメラ遺伝子を用いてシトロバクテル、エンテロバクテル (*Enterobacter*)、クロスツリジウム、クレブシエラ、アエロバクテル (*Aerobacter*)、ラクトバシルス、アスペルギルス (*Aspergillus*)、サッカロミセス、シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*)、チゴサッカロミセス (*Zygosaccharomyces*)、ピチア (*Pichia*)、クルイベロミセス (*Kluyveromyces*)、カンジダ (*Candida*)、ハンセンヌラ (*Hansenula*)、デバリオミセス (*Debaryomyces*)、ムコル (*Mucor*)、トルロプシス (*Torulopsis*)、メチロバクテル (*Methylobacter*)、サルモネラ (*Salmonella*)、バシルス (*Bacillus*)、アエロバクテル (*Aerobacter*)、ストレプトミセス (*Streptomyces*)、エシェリキア及びシュードモナス (*Pseudomonas*) より成る群から選ばれる微生物を形質転換することができる。E. コリが好ましい宿主である。

【0023】

従って本発明は：(a) グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子；(b) グリセロール-3-ホスファターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子；(c) デヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子；(d) デヒドラターゼ再活性化因子をコードする少なくとも1つの遺伝子；(e) 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを1, 3-プロパンジオール

ールに転換するのに十分な非-特異的触媒活性をコードする少なくとも1つの内因性遺伝子を含み、1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする機能性d h a T遺伝子が存在しない1, 3-プロパンジオールの生産に有用な組換え微生物を提供する。好ましい態様は、d h a T遺伝子が存在しない組換え微生物（好ましくはE. コリ）である。場合により組換え微生物は：（a）グリセロールキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子；（b）グリセロールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子；（c）トリオースリン酸イソメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子より成る群から選ばれる内因性遺伝子において突然変異（例えば欠失突然変異又は点突然変異）を含んでいることができる。

又 他の態様において、本発明は：（a）適した条件下で、d h a レギュロンを含み且つ1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ活性をコードする機能性d h a T遺伝子が欠けている組換えE. コリを単糖類、オリゴ糖類、多糖類及び1-炭素基質より成る群から選ばれる少なくとも1つの炭素源と接触させ；（b）（a）で生産される1, 3-プロパンジオールを場合により回収することを含む1, 3-プロパンジオールの生産のための方法を含む。

【0024】

本発明は：（a）本発明の組換え微生物を単糖類、オリゴ糖類、多糖類及び1-炭素基質より成る群から選ばれる少なくとも1つの炭素源と接触させ、それにより1, 3-プロパンジオールを生産し；（b）（a）で生産される1, 3-プロパンジオールを場合により回収することを含む、組換え微生物からの1, 3-プロパンジオールの生産のための方法も提供する。

【0025】

同様に、本発明は：

（a）（i）デヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子；

（i i）デヒドラターゼ再活性化因子をコードする少なくとも1つの遺伝子；

（i i i）3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを1, 3-プロパンジ

オールに転換するのに十分な非一特異的触媒活性をコードする少なくとも1つの内因性遺伝子

を含み；1，3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする機能性 *dhaT* 遺伝子が存在しない組換え微生物を、グリセロール及びジヒドロキシアセトンより成る群から選ばれる少なくとも1つの炭素源と接触させ、そこにおいて1，3-プロパンジオールを生産し；

(b) (a) で生産される1，3-プロパンジオールを場合により回収することを含む、組換え微生物からの1，3-プロパンジオールの生産のための方法を提供することを目的とする。

【0026】

本発明のさらに別の側面は炭素基質の共一供給を提供する。1，3-プロパンジオールの生産のためのこの態様において、段階は：(a) 組換えE. コリを第1の炭素源及び第2の炭素源と接触させ、該組換えE. コリは：(i) デヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの外因性遺伝子；

(i i) デヒドラターゼ再活性化因子をコードする少なくとも1つの外因性遺伝子；(i i i) 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを1，3-プロパンジオールに転換するのに十分な非一特異的触媒活性をコードする少なくとも1つの外因性遺伝子を含み、ここで組換えE. コリ中に1，3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ活性をコードする機能性 *dhaT* 遺伝子は存在せず、且つここで該第1の炭素源はグリセロール及びジヒドロキシアセトンより成る群から選ばれ、該第2の炭素源は単糖類、オリゴ糖類、多糖類及び1-炭素基質より成る群から選ばれ；(b) (a) で生産される1，3-プロパンジオールを場合により回収する段階である。共一供給は連続的又は同時であることができる。共一供給の態様において用いられる組換えE. コリはさらに：(a) (i) グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子；(i i) グリセロール-3-ホスファターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子；及び(i i i) *dhaR*、*orfY*、*orfX*、*orfW*、*dhaB1*、*dhaB2*、*dhaB3*及び*orfZ*の遺伝子産物をコードする遺伝子の少なくとも1つのサブセットより成る1組の外因

性遺伝子、ならびに (b) 各遺伝子が遺伝子を不活性化する突然変異を有し： (i) グリセロールキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子； (i i) グリセロールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子；及び (I I I) トリオースリン酸イソメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子より成る 1 組の内因性遺伝子を含むことができる。

【0027】

有用な組換え E. コリ株には、 (a) 各遺伝子が遺伝子を不活性化する突然変異を有し： (i) グリセロールキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子；及び (i i) グリセロールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子より成る 2 つの内因性遺伝子の 1 組； (b) グリセロール 3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの外因性遺伝子； (c) グリセロール 3-ホスファターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの外因性遺伝子；ならびに (d) プラスミド p K P 3 2 を含む組換え E. コリ株 K L P 2 3 ならびに (a) 各遺伝子が遺伝子を不活性化する突然変異を有し： (i) グリセロールキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子； (i i) グリセロールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子；及び (i i i) トリオースリン酸イソメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子より成る 3 つの内因性遺伝子の組を含む組換え E. コリ株 R J 8 が含まれる。

【0028】

他の有用な態様には： (a) (i) デヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの遺伝子； (i i) グリセロール 3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの遺伝子； (i i i) グリセロール 3-ホスファターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの遺伝子；及び (i v) デヒドラターゼ再活性化因子をコードする少なくとも 1 つの遺伝子より成る 1 組の外因性遺伝子；ならびに (b) 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを 1, 3-プロパンジオールに転換する非-特異的触媒活性をコードする少なくとも 1 つの内因性遺伝子を含む組換え E. コリが含まれ、ここで組換え E. コリ中には 1, 3-プロパンジオールオキシド

レダクターゼ活性をコードする機能性 d h a T 遺伝子が存在しない。

【0029】

別の態様は：(a) (i) グリセロール 3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子；(ii) グリセロール 3-ホスファターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子；及び(iii) d h a R、o r f Y、o r f X、o r f W、d h a B 1、d h a B 2、d h a B 3 及び o r f Z の遺伝子産物をコードする遺伝子の少なくとも1つのサブセットより成る1組の外因性遺伝子、ならびに(b) 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを1, 3-プロパンジオールに転換する非-特異的触媒活性をコードする少なくとも1つの内因性遺伝子を含む組換え E. コリであり、ここで組換え E. コリ中には1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ活性をコードする機能性 d h a T 遺伝子が存在しない。この態様は、それぞれの遺伝子が遺伝子を不活性化する突然変異を有する1組の内因性遺伝子をさらに含む組換え E. コリを用いる方法も包含し、該組は：(a) グリセロールキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子；(b) グリセロールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子；及び(c) トリオースリン酸イソメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子から成る。

【0030】

この態様はさらに、(a) 適した条件下で、開示したばかりの (i m m e d i a t e l y d i s c l o s e d) 組換え E. コリを単糖類、オリゴ糖類、多糖類及び1-炭素基質より成る群から選ばれる少なくとも1つの炭素源と接触させ、それにより1, 3-プロパンジオールを生産し；(b) (a) で生産される1, 3-プロパンジオールを場合により回収することを含む1, 3-プロパンジオールの生物的生産のための方法を含む。

【0031】

ならびに又、(a) さらに：(i) デヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの外因性遺伝子；(ii) デヒドラターゼ再活性化因子をコードする少なくとも1つの外因性遺伝子；(iii) 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを1, 3-プロパンジオールに転換する非-特異的触媒活性

をコードする少なくとも1つの内因性遺伝子を含む開示したばかりの態様の組換えE. コリをグリセロール及びジヒドロキシアセトンより成る群から選ばれる少なくとも1つの炭素源と接触させ、(b) (a) で生産される1, 3-プロパンジオールを場合により回収することを含む1, 3-プロパンジオールの生物的生产のためのさらに別の方法も包含する。

【0032】

【図面、配列の記載及び生物の寄託の簡単な記述】

本出願の各部を成す下記の詳細な記述、図、付随する配列の記載及び生物の寄託から、本発明をさらに十分に理解することができる。

【0033】

図1はd h a レギュロンサブクローン p H K 2 8 - 2 6 の配列内の遺伝子編成を表す。

【0034】

図2は本質的に実施例7に記載するビタミンB₁₂ の一定の供給を用いた2つの発酵実験の間で比較される細胞外可溶性タンパク質 (g/L) のグラフを表す。実線の1つの場合、用いられた株はK L P 2 3 / p A H 4 8 / p K P 3 2 であった。破線の他の場合、用いられた株はK L P 2 3 / p A H 4 8 / p D T 2 9 であった。

【0035】

図3は本質的に実施例7に記載するビタミンB₁₂ の一定の供給を用いた2つの発酵実験の間で比較される細胞生存率 [(生存細胞/mL) / OD 550] のグラフを表す。1つの場合 (実線)、用いられた株はK L P 2 3 / p A H 4 8 / p K P 3 2 であった。他の場合 (破線)、用いられた株はK L P 2 3 / p A H 4 8 / p D T 2 9 であった。

【0036】

図4は本質的に実施例7に記載する、しかしビタミンB₁₂ 又は補酵素B₁₂ の不在下における2つの発酵実験の間で比較されるグルコースからのグリセロールの収率のグラフを表す。1つの場合 (実線)、用いられた株はK L P 2 3 / p A H 4 8 / p K P 3 2 であった。他の場合 (破線)、用いられた株はK L P 2 3 / p

AH48/pDT29であった。

【0037】

図5は1, 3-プロパンジオールへのグルコースの代謝的転換を示す流れ図である。

【0038】

図6は未変性ゲル (native gel) 上の内因性E. コリオキシドレダクターゼ活性 (非-特異的触媒活性) を示すバンドから抽出される可溶性タンパク質画分を用いた2D-PAGE膜ブロットである。

【0039】

68の配列の記載及び本明細書に添付する配列表は、37 C. F. R. § 1. 821-1. 825 (“Requirements for Patent Applications Containing Nucleotide Sequences and/or Amino Acid Sequence Disclosures—the Sequence Rules”) に示されている特許出願におけるヌクレオチド及び／又はアミノ酸配列開示を管理している規則に従い、World Intellectual Property Organization (WIPO) Standard ST2. 5 (1988) ならびにEPO及びPCTの配列表条件 (Administration InstructionsのRules 5. 2及び49. 5 (a-bis) 及びSection 208及びAnnex C) と一致するであろう。配列の記載は、引用することによりその記載事項が本明細書の内容となるNucleic Acids Res. 13, 3021-3030 (1985) 及びBiochemical Journal 209, 345-373 (1984) に記載されているIUPAC-IYUB標準に準拠して定義されるヌクレオチド配列記号に関する1文字コード及びアミノ酸に関する3文字コードを含有する。

【0040】

配列番号: 1はpIBI31 (IBI Biosystem, New Haven, CT) 中にサブクローニングされ、pHK28-26と命名されたpKPl (クレブシエラ・ニューモニアエからのDNAを含有するコスミド) からの1

2. 1 kbのE c o R I - S a l Iフラグメントから決定されるヌクレオチド配列を含有する。表1がさらに配列番号：1内で同定される遺伝子、対応する塩基対及び関連する機能を詳細に示している。実施例1も参照されたい。

【0041】

配列番号：57はy q h Dに関して決定されるヌクレオチド配列を含有する。

【0042】

出願人等はB u d a p e s t T r e a t y o n t h e I n t e r n a t i o n a l R e c o g n i t i o n o f t h e D e p o s i t o f M i c r o o r g a n i s m s f o r t h e P u r p o s e s o f P a t e n t P r o c e d u r eの協約の下に以下の生物の寄託を行った：

配列番号：58はY a h Dに関して決定されるアミノ酸配列を含有する。

寄託者確認

国際寄託所

参照 (r e f e r e n c e)	名	寄託の日付
グリセロールデヒドラターゼ酵素をコードするクレブシエラゲノムの1部を含有する形質転換E. コリDH5 α	ATCC 69789	1995年4月18日
ジオールデヒドラターゼ酵素をコードするクレブシエラゲノムの1部を含有するコスミドp K P 4を含有する形質転換E. コリDH5 α	ATCC 69790	1995年4月18日
E. コリM S P 3 3 . 6	ATCC 98598	1997年11月25日
g l p K突然変異株	ATCC 98597	1997年11月25日
E. コリR J F 1 0 m		

寄託物は示した国際寄託所に少なくとも30年間保持され、それを開示している特許が認可されると公共に利用可能とされるであろう。寄託物の利用可能性は、政府の指令により認可される特許権の減損において本発明を実施する許諾を構成しない。

【0043】

本明細書で用いられる「A T C C」とは、1 0 8 0 1 U n i v e r s i t y

B l v d . , M a n a s s a s , V A 2 0 1 1 0 - 2 2 0 9 U . S . A .
にあるAmerican Type Culture Collection国際寄託所を指す。「ATCC番号」は、ATCCに寄託した際の培養物への受け入れ番号である。

【0044】

【発明の詳細な記述】

本発明は発酵可能な炭素源を直接1, 3-プロパンジオールに、1つの微生物を用いて生物的に転換するための改良法を提供する。該方法は増加した力価、収率及び細胞生存率ならびに発酵の間の細胞ライシスの減少を特徴とする。

【0045】

本発明は、1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ(d h a T)を含む1, 3-プロパンジオール発酵プロセスが培地中における高いレベルの3HPA及び他のアルデヒド及びケトンを特徴とし、それが細胞生存率の減少と関連しているという観察に部分的に基づいている。本発明は、モデル宿主であるE. コリが、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを1, 3-プロパンジオールに転換できる内因性非-特異的触媒活性により、3-HPAを1, 3-プロパンジオールに転換できるという予期せぬ発見にも部分的に基づいている。本発明はさらに、この非-特異的触媒活性を含み且つ機能性d h a Tが欠けているE. コリ発酵プロセスが発酵の間に細胞生存率の向上を生じ、機能性d h a Tを含む発酵プロセスより高い1, 3-プロパンジオールの力価及び／又は収率を与えるという予期せぬ発見に部分的に基づいている。

【0046】

1つの側面においては、グリセロールがモデル基質であり、宿主微生物は1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ活性がないように野生-型d h a Tにおける突然変異を有しており、且つ3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを1, 3-プロパンジオールに転換するのに十分な非-特異的触媒活性を含んでいる。他の側面においては、グルコースがモデル基質であり、組換えE. コリがモデル宿主である。この側面の場合、E. コリは3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを1, 3-プロパンジオールに転換するのに十分な内因性非-特異的触媒活性

を含んでいる。1つの態様の場合、非一特異的触媒活性はアルコールデヒドロゲナーゼである。

【0047】

1つの側面において、本発明は (a) グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子； (b) グリセロール-3-ホスファターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子； (c) デヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子； (d) デヒドラターゼ再活性化因子をコードする少なくとも1つの遺伝子；及び (e) 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを1, 3-プロパンジオールに転換するのに十分な非一特異的触媒活性をコードする少なくとも1つの内因性遺伝子を含む1群の遺伝子を発現する組換えE. コリを提供し；この微生物の使用は高い力価でグルコースを1, 3-プロパンジオールに転換する。本発明の他の側面において、この組換えE. コリ中の機能性 *dhaT* 遺伝子の除去は、以前に得られたより予期せぬ程高いグルコースからの1, 3-プロパンジオールの力価を与える。

【0048】

本発明は、1つの微生物における発酵可能な炭素源からの1, 3-プロパンジオールの生物的生産のための改良法を提供する。本発明の1つの側面において、1, 3-プロパンジオールへのグルコースの転換のための改良法は、クレブシエラ・ニューモニアエ *dhaレギュロン* 遺伝子 *dhaR*、*orfY*、*dhaT*、*orfX*、*orfW*、*dhaB1*、*dhaB2*、*dhaB3* 及び *orfZ* を用いて形質転換された宿主E. コリを含む組換え微生物の使用により達成され、これらの遺伝子のすべては野生型クレブシエラ・ニューモニアエ中に存在すると同じ遺伝子体制で配置される。発酵プロセスに関して得られる力価は、類似の発酵に関して以前に報告されたいずれの力価よりも有意に高い。この向上は実施例6及び実施例7で記載するプラスミド *pDT29* の使用に頼っている。

【0049】

本発明の他の側面において、G3PDH、G3Pホスファターゼ、デヒドラターゼ、デヒドラターゼ再活性化因子及び又機能性 *dhaT* をコードする遺伝子を

含有する組換えE. コリを用いる方法と比較して、グルコースからの1, 3-プロパンジオールの生産のためのさらに改良された方法が、G3PDH、G3Pホスファターゼ、デヒドラターゼ及びデヒドラターゼ再活性化因子をコードする遺伝子を含有する組換えE. コリを用いて達成される。劇的に改良された方法は、E. コリ中に存在する、アルコールデヒドロゲナーゼであると予測される非-特異的触媒活性をコードする内因性遺伝子に頼っている。

【0050】

該方法における劇的な向上は、実施例7及び9に示す1, 3-プロパンジオール力価の向上として明らかである。該方法における向上は、発酵ブイオン中の細胞外可溶性タンパク質濃度により決定される細胞ライシスの減少としても明らかである。本発明のこの側面を図2に示す。さらに該方法における向上は、発酵の経過に及ぶ長期間の細胞生存率 (prolonged cell viability) として明らかである。本発明のこの側面を図3に示す。さらに本発明における向上は収率の向上としても明らかである。1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ (dhaT) を発現するE. コリ (例えばプラスミドpDT29を用いて形質転換されたE. コリKLP23) においては、グリセロールは3-HPA以外の産物に代謝され得る。まさに対照的に、1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ (dhaT) を発現しないE. コリ (例えばプラスミドpKP32を用いて形質転換されたE. コリKLP23) においては、グリセロールは3-HPA以外の産物に代謝されない。この謎の経路が機能性dhaTの存在もしくは不在に帰せられ得ることは、図4に示すようなグルコースからのグリセロールのより低い収率により示される。

【0051】

本明細書で用いられる場合、特許請求の範囲及び明細書の説明のために以下の用語が用いられ得る。

【0052】

「グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ」及び「G3PDH」は、ジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) のグリセロール-3-リン酸 (G3P) への転換を触媒する酵素活性を担うポリペプチドを指す。生体内でG3PDHはN

ADH ; NADPH ; 又はFAD-依存性であることができる。補因子特異的グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼを特定の指す場合、「NADH-依存性グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ」、「NADPH-依存性グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ」及び「FAD-依存性グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ」の用語が用いられるであろう。NADH-依存性及びNADPH-依存性グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼがNADH及びNADPHを互換的に用いることができるのが一般に実情なので（例えばg p s Aによりコードされる遺伝子により）、NADH-依存性及びNADPH-依存性グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼの用語は互換的に用いられるであろう。NADH-依存性酵素（E. C. 1. 1. 1. 8）は例えばGPD1（GenBank Z74071x2）又はGPD2（GenBank Z35169x1）又はGPD3（GenBank G984182）又はDAR1（GenBank Z74071x2）を含むいくつかの遺伝子によりコードされる。NADPH-依存性酵素（EC 1. 1. 1. 94）はg p s A（GenBank U321643、（c d s 197911-196892）G466746及びL45246）によりコードされる。FAD-依存性酵素（EC 1. 1. 99. 5）はGUT2（GenBank Z47047x23）又はg l p D（GenBank G147838）又はg l p A B C（GenBank M20938）によりコードされる（引用することによりその記載事項が本明細書の内容となるWO 9928480及びその中の引用文献を参照されたい）。

【0053】

「グリセロール-3-ホスファターゼ」、「s n-グリセロール-3-ホスファターゼ」又は「d, 1-グリセロールホスファターゼ」及び「G3Pホスファターゼ」という用語は、グリセロール-3-リン酸と水のグリセロールと無機リン酸塩への転換を触媒する酵素活性を担うポリペプチドを指す。G3Pホスファターゼは例えばGPP1（GenBank Z47047x125）又はGPP2（GenBank U18813x11）によりコードされる（引用することによりその記載事項が本明細書の内容となるWO 9928480及びその中の引用文献を参照されたい）。

【0054】

「グリセロールキナーゼ」という用語は、グリセロールとATPのグリセロール-3-リン酸とADPへの転換を触媒する酵素活性を担うポリペプチドを指す。高エネルギーリン酸ドナーATPを生理学的代用物（例えばホスホエノールピルビン酸）により置き換えることができる。グリセロールキナーゼは例えばGUT1 (GenBank U11583x19) 及びglpK (GenBank L19201) によりコードされる（引用することによりその記載事項が本明細書の内容となるWO 9928480及びその中の引用文献を参照されたい）。

【0055】

「グリセロールデヒドロゲナーゼ」という用語は、グリセロールのジヒドロキシアセトンへの (E. C. 1. 1. 1. 6) 又はグリセロールのグリセルアルデヒドへの (E. C. 1. 1. 1. 72) の転換を触媒する酵素活性を担うポリペプチドを指す。グリセロールのジヒドロキシアセトンへの転換を触媒する酵素活性を担うポリペプチドは「ジヒドロキシアセトンレダクターゼ」とも言われる。グリセロールデヒドロゲナーゼはNADH (E. C. 1. 1. 1. 6)、NADPH (E. C. 1. 1. 1. 72) 又は他の補因子（例えばE. C. 1. 1. 99. 22）に依存性であることができる。NADH-依存性グリセロールデヒドロゲナーゼは例えばglpA (GenBank U000006) によりコードされる（引用することによりその記載事項が本明細書の内容となるWO 9928480及びその中の引用文献を参照されたい）。

【0056】

「デヒドラターゼ酵素」又は「デヒドラターゼ」という用語は、産物3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドへのグリセロール分子の転換を触媒する酵素活性を指す。本発明の目的の場合、デヒドラターゼ酵素はグリセロールデヒドラターゼ (E. C. 4. 2. 1. 30) 及びジオールデヒドラターゼ (E. C. 4. 2. 1. 28) を含み、それぞれグリセロール及び1, 2-プロパンジオールの好ましい基質を有する。デヒドラターゼ酵素のための遺伝子はクレブシエラ・ニューモニアエ、シトロバクテル・フレウンジイ、クロスツリジウム・パステウリアヌ

ム、サルモネラ・チフィウム及びクレブシエラ・オキシトカにおいて同定されている。それぞれの場合にデヒドラターゼは3つのサブユニット：大もしくは「 α 」サブユニット、中もしくは「 β 」サブユニット及び小もしくは「 γ 」サブユニットから構成されている。文献中で用いられる遺伝子命名法が多様なので、同定を容易にするために比較チャートを表1に示す。遺伝子は例えばDaniel et al. (FEMS Microbiol. Rev. 22, 553 (1999)) 及びToraya and Mori (J. Biol. Chem. 274, 3372 (1999)) にも記載されている。表1を参照すると、グリセロールデヒドラターゼの大もしくは「 α 」サブユニットをコードする遺伝子はdhaB1、gldA及びdhaBを含み；中もしくは「 β 」サブユニットをコードする遺伝子はdhaB2、gldB及びdhaCを含み；小もしくは「 γ 」サブユニットをコードする遺伝子はdhaB3、gldC及びdhaEを含む。やはり表1を参照すると、ジオールデヒドラターゼの大もしくは「 α 」サブユニットをコードする遺伝子はpduC及びpddAを含み；中もしくは「 β 」サブユニットをコードする遺伝子はpduD及びpddBを含み；小もしくは「 γ 」サブユニットをコードする遺伝子はpduE及びpddCを含む。

【0057】

【表1】

表1:デヒドラーゼ及びデヒドラーゼ関連機能に関する遺伝子名及びGenBank参照の比較チャート
遺伝子機能:

生物(GenBank参照)	調節		未知		再活性化		1,3-PDデヒドロナーゼ		未知	
	遺伝子	塩基対	遺伝子	塩基対	遺伝子	塩基対	遺伝子	塩基対	遺伝子	塩基対
K.ニューモニエ(K.pneumoniae)(配列番号:1)	dhaR	2209-4134	orfW	4112-4642	orfX	4643-4996	dhaT	5017-6108	orfY	6202-6630
K.ニューモニエ(K.pneumoniae)(U09093)			orfZc	7116-7646	orfZb	6762-7115	dhaT	5578-6741	orfZa	5125-5556
K.ニューモニエ(K.pneumoniae)(U09092)					gdrB					
C.フレグジイ(C.freundii)(U09771)	dhaR	3746-5671	orfW	5649-6179	orfX	6180-6533	dhaT	6550-7713	orfY	7736-8164
C.ハズカリ73Δ(C.pasteurianum)(AF051373)										
C.ハズカリ73Δ(C.pasteurianum)(AF006034)			orfW	210-731	orfX	1-196	dhaT	1232-2389	orfY	746-1177
S.チリウム(S.typhimurium)(AF026270)					pduH	8274-8645				
K.オキシホカ(K.oxytoca)(AF017781)					dhrB	2063-2440				
K.オキシホカ(K.oxytoca)(AF051373)										

遺伝子機能:

生物(GenBank参照)	デヒドラーゼα		デヒドラーゼβ		デヒドラーゼγ		再活性化	
	遺伝子	塩基対	遺伝子	塩基対	遺伝子	塩基対	遺伝子	塩基対
K.ニューモニエ(K.pneumoniae)(配列番号:1)	dhaB1	7044-8711	dhaB2	8724-9308	dhaB3	9311-9736	orfZ	9749-11572
K.ニューモニエ(K.pneumoniae)(U09093)	dhaB1	3047-4714	dhaB2	2450-2890	dhaB3	2022-2447	dhaB4	186-2009
K.ニューモニエ(K.pneumoniae)(U09092)	gldA	121-1788	gldB	1801-2385	gldC	2388-2813	gdrA	
C.フレグジイ(C.freundii)(U09771)	dhaB	8556-10223	dhaC	10235-10819	dhaE	10822-11250	orfZ	11261-13072
C.ハズカリ73Δ(C.pasteurianum)(AF051373)	dhaB	84-1748	dhaC	1779-2318	dhaE	2333-2773	orfZ	2790-4598
C.ハズカリ73Δ(C.pasteurianum)(AF006034)								
S.チリウム(S.typhimurium)(AF026270)	pduC	3557-5221	pduD	5232-5906	pduE	5921-6442	pduG	6452-8284
K.オキシホカ(K.oxytoca)(AF017781)							dhrA	241-2073
K.オキシホカ(K.oxytoca)(AF051373)	pddA	121-1785	pddB	1796-2470	pddC	2485-3006		

【0058】

グリセロール及びジオールデヒドラターゼはグリセロール及びいくつかの他の基質による機構に基づく自殺不活性化を受け易い (Daniel et al.

， F E M S M i c r o b i o l . R e v . 2 2 , 5 5 3 (1 9 9 9)) 。 「デヒドラターゼ再活性化因子」という用語は、デヒドラターゼ活性の再活性化を担うタンパク質を指す。「デヒドラターゼ再活性化活性」、「デヒドラターゼ活性の再活性化」又は「デヒドラターゼ活性の再生」という用語は、基質への触媒作用のできないデヒドラターゼを基質への触媒作用のできるものに転換する現象あるいはデヒドラターゼの不活性化を阻害する現象あるいは生体内におけるデヒドラターゼ酵素の有効半減期を延長する現象を指す。2つのタンパク質がデヒドラターゼ再活性化因子として含まれるものとして同定されている（引用することによりその記載事項が本明細書の内容となるWO 9821341 (US 6013494) 及びその中の引用文献；Daniel et al.， 同上；Toraya and Mori, J. Biol. Chem. 274, 3372 (1999)；及びTobimatsu et al.， J. Bacteriol. 181, 4110 (1999)を参照されたい）。表1を参照すると、タンパク質の1つをコードする遺伝子はorf Z、dha B4、gdr A、pdu G及びddr Aを含む。やはり表1を参照すると、2つのタンパク質の第2のものをコードする遺伝子はorf X、orf 2b、gdr B、pdu H及びddr Bを含む。

【0059】

「1，3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ」、「1，3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼ」又は「Dha T」という用語は、3-HPAと1，3-プロパンジオールの相互転換を触媒することができる酵素活性を担う単数もしくは複数のポリペプチドを指し、但し、そのような活性をコードする単数もしくは複数の遺伝子はその自然の（すなわち野生型の）背景（setting）においてデヒドラターゼ酵素に物理的又は転写的に結合していることが見いだされており；例えば該遺伝子はクレブシエラ・ニューモニアエからのdha Tの場合にそうであるようにdha レギュロン内で見いだされる。表1を参照すると、1，3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子はクレブシエラ・ニューモニアエ、シトロバクテル・フレウンジイ及びクロスツリジウム・パステウリアヌムからのdha Tを含む。これらの遺伝子のそれぞれはIII型アル

コールデヒドロゲナーゼの群に属するポリペプチドをコードし、保存された鉄-結合モチーフを示し、3-HPAと1, 3-プロパンジオールの NAD^+/NADH 結合相互転換に関する優先性を有する (Johnson and Lin, J. Bacteriol. 169, 2050 (1987); Daniel et al., J. Bacteriol. 177, 2151 (1995); 及び Leurs et al., FEMS Microbiol. Lett. 154, 337 (1997))。類似の物理的性質を有する酵素がラクトバシルス・ブレビス及びラクトバシルス・ブクネリから単離されている (Veiga da Dunha and Foster, Appl. Environ. Microbiol. 58, 2005 (1992))。

【0060】

「dhaレギュロン」という用語は、デヒドラターゼ活性、再活性化活性及び1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼを含むがこれらに限られない種々の生物学的活性をコードする1組の関連遺伝子又は読取り枠を指す。典型的には、dhaレギュロンは本明細書に記載する読取り枠dhaR、orfY、dhaT、orfX、orfW、dhaB1、dhaB2、dhaB3及びorfZを含む。

【0061】

「非-特異的触媒活性」という用語は、3-HPAと1, 3-プロパンジオールの相互転換を触媒するのに十分な酵素活性を担う単数もしくは複数のポリペプチドを指し、特に単数もしくは複数の1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼを含む。典型的には、これらの酵素はアルコールデヒドロゲナーゼである。そのような酵素は NAD^+/NADH 以外の補因子を利用することができ、それらにはFAD又はFMNのようなフラビンが含まれるがこれらに限られない。単数もしくは複数の非-特異的アルコールデヒドロゲナーゼのための単数もしくは複数の遺伝子は、例えば微生物E. コリKLP23内で内因的にコードされ、且つ機能的に発現されることが見いだされる。

【0062】

「機能」又は「酵素機能」という用語は、特定の化学反応を行うために必要な

エネルギーの改変における酵素の触媒活性を指す。そのような活性を、適した条件下で産物又は基質のいずれかの生産が行われ得る平衡における反応に適用し得ることが理解される。

【0063】

「ポリペプチド」及び「タンパク質」という用語は互換的に用いられる。

【0064】

「炭素基質」及び「炭素源」という用語は、本発明の宿主微生物により代謝され得る炭素源、そして特に単糖類、オリゴ糖類、多糖類及び1-炭素基質又はそれらの混合物より成る群から選ばれる炭素源を指す。

【0065】

「宿主細胞」又は「宿主微生物」という用語は、異種遺伝子 (foreign or heterologous genes) を受容し、且つこれらの遺伝子を発現して活性な遺伝子産物を生産できる微生物を指す。

【0066】

「異種遺伝子 (foreign gene)」、「異種DNA (foreign DNA)」、「異種遺伝子 (heterologous gene) 及び「異種DNA (heterologous DNA)」という用語は、種々の手段により宿主微生物内に置かれた、1つの生物にとって自然である (native) 遺伝物質を指す。問題の遺伝子は自然に存在する遺伝子、突然変異遺伝子又は合成遺伝子であることができる。

【0067】

「形質転換」及び「トランスフェクション」という用語は、核酸の導入の後の細胞における新しい遺伝子の獲得を指す。獲得した遺伝子を染色体DNA中に組込むか、又は染色体外複製配列として導入することができる。「形質転換細胞」という用語は、形質転換の産物を指す。

【0068】

「遺伝的に改変された」という用語は、形質転換又は突然変異により遺伝物質を変更するプロセスを指す。

【0069】

「組換え微生物」及び「形質転換された宿主」という用語は、異種遺伝子又は同種遺伝子 (homologous genes) の余分のコピーを用いて形質転換された微生物を指す。本発明の組換え微生物は、適した炭素基質からの1, 3-プロパンジオールの生産のためにグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GPD1)、グリセロール-3-ホスファターゼ (GPP2)、グリセロールデヒドラターゼ (dhaB1、dhaB2及びdhaB3)、デヒドラターゼ再活性化因子 (orfZ及びorfX) ならびに場合により1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ (dhaT) をコードする異種遺伝子を発現する。好ましい態様は、これらの遺伝子を用いて形質転換されているが機能性dhaTを欠いているE. コリである。開示する遺伝子ならびに特に単数もしくは複数の1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ (dhaT) を除く3-HPA及び1, 3-プロパンジオールの相互転換のための非-特異的触媒活性のための遺伝子を含有するように、E. コリ以外の宿主微生物を形質転換することもできる。

【0070】

「遺伝子」は、特定のタンパク質を発現する核酸フラグメントを指し、コード領域に先行する (5' 非-コード) 及び続く (3' 非-コード) 調節配列を含む。「自然の」及び「野生型」という用語は、それ自身の調節配列を有して自然に存在する遺伝子を指す。

【0071】

「コード (encoding)」及び「コード (coding)」という用語は、遺伝子が転写及び翻訳の機構を介してアミノ酸配列を生産するプロセスを指す。特定のアミノ酸配列をコードするプロセスは、コードされるアミノ酸における変化を引き起こさない塩基の変化を含み得るDNA配列、あるいは1つもしくはそれより多くのアミノ酸を改変させ得るが、DNA配列によりコードされるタンパク質の機能性に影響しない塩基の変化を含むDNA配列を含むと理解される。従って本発明は特定の代表的配列以上のものを包含すると理解される。

【0072】

「単離された」という用語は、自然にはそれに伴っている少なくとも1つの成

分から取り出されるタンパク質又はDNA配列を指す。

【0073】

「単離された核酸分子」は、1本鎖もしくは2本鎖であり、場合により合成の、非一天然の、もしくは改変されたヌクレオチド塩基を含有することができるRNAもしくはDNAのポリマーである。DNAのポリマーの形態における単離された核酸分子はcDNA、ゲノムDNA又は合成DNAの1つもしくはそれより多いセグメントを含み得る。

【0074】

「実質的に類似の」は、1つもしくはそれより多くのヌクレオチド塩基における変化が1つもしくはそれより多いアミノ酸の置換を生ずるが、DNA配列によりコードされるタンパク質の機能性に影響しない核酸分子を指す。「実質的に類似の」は、1つもしくはそれより多くのヌクレオチド塩基における変化がアンチセンス又は共抑制法 (c o - s u p p r e s s i o n t e c h n o l o g y) により、遺伝子発現の改変を媒介する核酸分子の能力に影響しない核酸分子も指す。「実質的に類似の」は、アンチセンスもしくは共抑制法による遺伝子発現の改変あるいは得られるタンパク質分子の機能性の改変を媒介する能力に関連して (v i s - a - v i s) 、得られる転写産物の機能性に実質的に影響しない、本発明の核酸分子の修正 (例えば1つもしくはそれより多いヌクレオチド塩基の欠失又は挿入) も指す。本発明は特定の代表的配列以上の物を包含する。

【0075】

例えば与えられる部位において化学的に同等のアミノ酸の生産を生ずるが、コードされるタンパク質の機能性に影響しない遺伝子における改変が普通であることは当該技術分野において周知である。本発明の目的のために、置換を以下の5つの群の1つ内における交換として定義する：

1. 小さい脂肪族の、非極性もしくはわずかに極性の残基：A l a、S e r、T h r (P r o, G l y) ；
2. 極性の、負に帯電した残基及びそれらのアミド：A s p、A s n、G l u、G l n ；
3. 極性の、正に帯電した残基：H i s、A r g、L y s ；

4. 大きい脂肪族の、非極性残基：M e t、L e u、I l e、V a l (C y s)
); 及び

5. 大きい芳香族残基：P h e、T y r、T r p。

【0076】

かくして疎水性アミノ酸であるアミノ酸アラニンのためのコドンは別のもっと疎水性の低い残基（例えばグリシン）あるいはもっと疎水性の高い残基（例えばバリン、ロイシンもしくはイソロイシン）をコードするコドンにより置換され得る。同様に、1つの負に帯電した残基の別のもののために代わる置換（例えばグルタミン酸のために代わるアスパラギン酸）あるいは1つの正に帯電した残基の別のもののために代わる置換（例えばアルギニンのために代わるリシン）を生ずる変化も機能的に同等の産物を生産すると予測され得る。

【0077】

多くの場合、タンパク質分子のN-末端及びC-末端部分の改変を生ずるヌクレオチド変化もタンパク質の活性を改変するとは予測されない。

【0078】

提案される修正のそれぞれは十分に当該技術分野における日常的熟練の範囲内であり、コードされる産物の生物学的活性の保持の決定もそうである。さらに熟練者には、本発明により包含される実質的に類似の配列が、緊縮条件（0.1X SSC、0.1% SDS、65℃ならびに2X SSC、0.1% SDS及び続いて0.1X SSC、0.1% SDSを用いる洗浄）下で本明細書に例示する配列とハイブリダイゼーションするそれらの能力によっても定義されることがわかる。本発明の好ましい実質的に類似の核酸フラグメントは、そのDNA配列が本明細書に報告する核酸フラグメントのDNA配列と少なくとも80%同じである核酸フラグメントである。より好ましい核酸フラグメントは、本明細書に報告する核酸フラグメントのDNA配列と少なくとも90%同じである。最も好ましいのは、本明細書に報告する核酸フラグメントのDNA配列と少なくとも95%同じ核酸フラグメントである。

【0079】

核酸フラグメントは、1本鎖形態の核酸フラグメントに適した温度及び溶液イ

オン強度の条件下で他の核酸フラグメントにアニーリングできる場合、cDNA、ゲノムDNA又はRNAのような別の核酸フラグメントに「ハイブリダイゼーション可能」である。ハイブリダイゼーション及び洗浄条件は周知であり、Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989)、特にその中のChapter 11及びTable 11.1 (引用することによりその記載事項全体が本明細書の内容となる) に例示されている。温度及びイオン強度の条件はハイブリダイゼーションの「緊縮性」を決定する。相同核酸に関する予備的スクリーニングのために、 55° の T_m に対応する、例えば5XSSC、0.1%SDS、0.25%ホルムアミドなし；あるいは30%ホルムアミド、5XSSC、0.5%SDSの低緊縮性ハイブリダイゼーション条件を用いることができる。中緊縮性ハイブリダイゼーション条件はもっと高い T_m 、例えば40%ホルムアミド及び5Xもしくは6XSSCに対応する。ハイブリダイゼーションは、2つの核酸が相補配列を含有することを必要とするが、ハイブリダイゼーションの緊縮性に依存して、塩基間のミスマッチが可能である。ハイブリダイゼーションする核酸のための適した緊縮性は、当該技術分野において周知の変数である核酸の長さ及び相補性の程度に依存する。2つのヌクレオチド配列の間の類似性又は相同性の程度が高い程、これらの配列を有する核酸のハイブリッドのための T_m の値が大きい。核酸ハイブリダイゼーションの相対的安定性（より高い T_m に対応する）は以下の順序で低下する：RNA：RNA、DNA：RNA、DNA：DNA。長さが100ヌクレオチドより長いハイブリッドのために、 T_m を計算するための式が誘導されている（Sambrook et al., 同上, 9.50-9.51を参照されたい）。比較的短い核酸、すなわちオリゴヌクレオチドを用いるハイブリダイゼーションの場合、ミスマッチの位置がより重要となり、オリゴヌクレオチドの長さがその特異性を決定する（Sambrook et al., 同上, 9.50-9.51を参照されたい）。1つの態様において、ハイブリダ

イジェーション可能な核酸のための長さは少なくとも約10ヌクレオチドである。ハイブリダイゼーション可能な核酸のための好ましい最低の長さは少なくとも約15ヌクレオチド；より好ましくは少なくとも約20ヌクレオチドであり；そして最も好ましくは該長さは少なくとも30ヌクレオチドである。さらに熟練者には、温度及び洗浄溶液塩濃度をプローブの長さのような因子に従って必要通りに調整できることがわかるであろう。

【0080】

「実質的部分」は、当該技術分野における熟練者による配列の手動の評価又はコンピューター自動化配列比較及びBLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1993); www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/も参照されたい) のようなアルゴリズムを用いる同定により、ポリペプチド又は遺伝子の推定的同定を与えるのに十分なポリペプチドのアミノ酸配列又は遺伝子のヌクレオチド配列を含むアミノ酸又はヌクレオチド配列を指す。一般に、ポリペプチド又は核酸配列を既知のタンパク質又は遺伝子に相同であると推定的に同定するためには、10もしくはそれより多い連続アミノ酸又は30もしくはそれより多いヌクレオチドの配列が必要である。さらにヌクレオチド配列に関し、20～30の連続ヌクレオチドを含む遺伝子-特異的オリゴヌクレオチドプローブを、遺伝子同定の配列-依存的方法（例えばサザンハイブリダイゼーション）及び単離（例えばバクテリアコロニー又はバクテリオファージプラークのその場ハイブリダイゼーション）において用いることができる。さらに、12～15塩基の短いオリゴヌクレオチドをPCRにおける増幅プライマーとして用い、プライマーを含む特定の核酸分子を得ることができる。従って、ヌクレオチド配列の「実質的部分」は、配列を含む核酸分子の特異的同定及び／又は単離を与えるのに十分な配列を含む。本明細書は、1つもしくはそれより多い特定のタンパク質をコードする部分的もしくは完全なアミノ酸及びヌクレオチド配列を記載する。本明細書に報告する配列の恩恵を受ける熟練者は今や、当該技術分野における熟練者に既知の目的のために、開示される配列のすべて又は実質的部分を用いることができる。従って本発明は付

随する配列表において報告する完全な配列ならびに上記で限定した配列の実質的部分を含む。

【0081】

「相補的」という用語は、互いにハイブリダイゼーションすることができるヌクレオチド塩基間の関係を記述する。例えばDNAに関し、アデノシンはチミンに相補的であり、シトシンはグアニンに相補的である。従って本発明は、付随する配列表において報告する完全な配列ならびに実質的に類似の核酸配列に相補的である単離された核酸分子も含む。

【0082】

当該技術分野において既知の「パーセント同一性」という用語は、配列の比較により決定される2つもしくはそれより多くのポリペプチド配列又は2つもしくはそれより多くのポリヌクレオチド配列の間の関係である。当該技術分野において「同一性」も、場合次第でポリペプチドもしくはポリヌクレオチド配列の列 (strings) の間の対合により決定されるポリペプチドもしくはポリヌクレオチド配列の間の配列関連性の程度を意味する。「同一性」及び「類似性」は既知の方法により容易に計算することができ、該方法には: Computational Molecular Biology; Lesk, A. M., Ed.; Oxford University Press: New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects; Smith, D. W., Ed.; Academic Press: New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I; Griffin, A. M. and Griffin, H. G., Eds; Humana Press: New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology; von Heinje, G., Ed.; Academic Press: New York, 1987; 及び Sequence Analysis Primer; Gribskov, M. and Deveraux, J., Eds.; Stockton Press: New York, 1991に記載されている方法が含まれるがこれらに限られない。同一

性の決定の好ましい方法は、調べられている配列の間の最大の対合を与えるように設計される。

【0083】

同一性及び類似性を決定する方法は公共的に入手可能なコンピュータプログラムにおいて系統化されている。2つの配列の間の同一性及び類似性を決定する好ましいコンピュータプログラム法には、ギャップクリエーションペナルティー (gap creation penalty) = 12 及びギャップエクステンションペナルティー (gap extension penalty) = 4 のそれらの標準的デフォルト値を有する Needleman and Wunsch アルゴリズムを用いる GCG プログラムパッケージ中に存在する GCG Pileup プログラム (Devereux et al., Nucleic Acids Res. 12:387-395 (1984))、BLASTP、BLASTN 及び FASTA (Pearson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448 (1988)) が含まれるがこれらに限られない。BLASTX プログラムは NCBI 及び他の供給源から公共的に入手可能である (BLAST Manual, Altschul et al., Natl. Cent. Biotechnol. Inf., Natl. Library Med. (NCBI NLM) NIH, Bethesda, Md. 20894; Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990); Altschul et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997))。パーセント同一性の決定のための他の好ましい方法は、Jotun-Hein アルゴリズムを用いる DNASTAR タンパク質整列案の方法による (Hein et al., Methods Enzymol. 183:626-645 (1990))。整列に関する Jotun-Hein 法のためのデフォルトパラメーターは：複数の整列の場合、ギャップペナルティー (gap penalty) = 11、ギャップレングスペナルティー (gap le

length penalty) = 3 ; 対毎の整列の場合、k tuple = 6である。例えば、参照ヌクレオチド配列への少なくとも例えば95%の「同一性」を有するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドにより、ポリヌクレオチド配列が参照ヌクレオチド配列の各100ヌクレオチドあたりに最高で5つの点突然変異を含み得ることを除いて、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が参照配列に同一であることを意味する。言い換えると、参照ヌクレオチド配列に少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを得るためには、参照配列中のヌクレオチドの最高で5%を欠失させるか、又は他のヌクレオチドで置換することができるか、あるいは参照配列中の合計ヌクレオチドの最高で5%の数のヌクレオチドを参照配列中に挿入することができる。参照配列のこれらの突然変異は、参照ヌクレオチド配列の5'もしくは3'末端位置、あるいはそれらの末端位置の間のどこかに、参照配列内で参照配列中のヌクレオチドの間に個別に、あるいは1つもしくはそれより多い連続した群として散らばって存在することができる。類似して、参照アミノ酸配列に少なくとも例えば95%の同一性を有するアミノ酸配列を持つポリペプチドにより、ポリペプチド配列が参照アミノ酸の各100アミノ酸あたりに最高で5つのアミノ酸改変を含み得ることを除いて、ポリペプチドのアミノ酸配列が参照配列に同一であることを意味する。言い換えると、参照アミノ酸配列に少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るためには、参照配列中のアミノ酸残基の最高で5%を欠失させるか、又は他のアミノ酸で置換することができるか、あるいは参照配列中の合計アミノ酸残基の最高で5%の数のアミノ酸を参照配列中に挿入することができる。参照配列のこれらの改変は、参照アミノ酸配列のアミノもしくはカルボキシ末端位置あるいはそれらの末端位置の間のどこかに、参照配列内で参照配列中の残基の間に個別に、又は1つもしくはそれより多い連続した群として散らばって存在することができる。

【0084】

「同種 (homologous)」という用語は、与えられる宿主細胞において本来の、又は自然に存在するタンパク質又はポリペプチドを指す。本発明は組換えDNA法を介して同種タンパク質を生産する微生物を含む。

【0085】

「パーセント相同性」という用語は、ポリペプチド間のアミノ酸配列同一性の程度を指す。第1のアミノ酸配列が第2のアミノ酸配列に同一である場合、第1及び第2のアミノ酸配列は100%の相同性を示す。2つのポリペプチド間の相同性は、両配列中の与えられる位置において対合するアミノ酸の合計数の一次関数であり、例えば2つの配列の両方におけるアミノ酸の合計数の半分が同じ場合、2つの配列は50%の相同性を示すと言われる。

【0086】

「コドン縮重」は、コードされるポリペプチドのアミノ酸配列に影響のないヌクレオチド配列の変動を許す遺伝コードにおける分岐進化 (divergence) を指す。従って本発明は、配列番号：57に示すアミノ酸配列のすべてもしくは実質的部分をコードするいずれの核酸分子にも関する。熟練者は、与えられるアミノ酸を特定するためのヌクレオチドコドンの使用において特定の宿主細胞により示される「コドンバイアス」を十分に承知している。従って宿主細胞における発現を向上させるために遺伝子を合成する場合、遺伝子のコドン使用の頻度が宿主細胞の好ましいコドン使用の頻度に近づくように遺伝子を設計するのが望ましい。

【0087】

得られるタンパク質分子の機能性に実質的に影響しないサイレント変化 (silent changes) を生ずる配列における欠失、挿入又は置換のような配列への修正も意図されている。例えば遺伝コードの縮重を反映するか、又は与えられる部位において化学的に同等のアミノ酸の生産を生ずる遺伝子配列における改変が意図されている。かくして疎水性アミノ酸であるアミノ酸アラニンのためのコドンを、他の疎水性がより低い残基、例えばグリシン又はより疎水性の残基、例えばバリン、ロイシンもしくはイソロイシンをコードするコドンによって置換することができる。同様に、1つの負に帯電した残基の別のもののために代わる置換、例えばグルタミン酸のために代わるアスパラギン酸の置換、あるいは1つの正に帯電した残基の別のもののために代わる置換、例えばアルギニンのために代わるリシンの置換を生ずる変化も生物学的に同等の産物を生産すると予測

される。タンパク質分子のN-末端もしくはC-末端部分の改変を生ずるヌクレオチド変化もタンパク質の活性を改変するとは予測されない。いくつかの場合には、タンパク質の生物学的活性への改変の影響を研究するために、配列の突然変異体を作るのが実際に望ましいかも知れない。提案される修正のそれぞれは、十分に当該技術分野における日常的熟練の範囲内であり、コードされる産物における生物学的活性の保持の決定もそうである。さらに熟練者には、本発明により包含される配列が緊縮条件（0.1XSSC、0.1%SDS、65℃）下で本明細書に例示される配列とハイブリダイゼーションするそれらの能力によっても定義されることがわかる。

【0088】

「発現」という用語は、遺伝子産物の配列をコードする遺伝子からの遺伝子産物への転写及び翻訳を指す。

【0089】

「プラスミド」、「ベクター」及び「カセット」という用語は、多くの場合に細胞の中心代謝の一部ではなく、通常は環状2本鎖DNA分子の形態にある遺伝子を保有している染色体外要素を指す。そのような要素は、いずれかの源から誘導される1本もしくは2本鎖DNAもしくはRNAの線状もしくは環状の自律複製配列、ゲノム組込み配列、ファージ又はヌクレオチド配列であることができ、そこにおいては複数のヌクレオチド配列が適した3'非翻訳配列と共に選ばれた遺伝子産物のためのプロモーターフラグメント及びDNA配列を細胞中に導入することができる独特の構造に結合もしくは組み合わされている。「形質転換カセット」は、異種遺伝子を含有し且つ異種遺伝子の他に特定の宿主細胞の形質転換を助長する要素を有している特異的（specific）ベクターを指す。「発現カセット」は、異種遺伝子を含有し且つ異種遺伝子の他に異種宿主におけるその遺伝子の発現の増強を可能にする要素を有している特異的ベクターを指す。

組換え生物の構築

炭素基質の1,3-プロパンジオールへの転換のための酵素的経路をコードするであろう必要な遺伝子を含有する組換え生物を、当該技術分野において周知の方法を用いて構築することができる。グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナー

ゼ (GPD1)、グリセロール-3-ホスファターゼ (GPP2)、グリセロールデヒドラターゼ (dhaB1、dhaB2及びdhaB3)、デヒドラターゼ再活性化因子 (orfZ及びorfX) ならびに1, 3-プロパンジオールオキシシドレダクターゼ (dhaT) をコードする遺伝子をクレブシエラ又はサッカロミセスのような本来の宿主から単離し、E. コリDH5 α 、ECL707、AA200又はKLP23のような宿主株の形質転換に用いた。

遺伝子の単離

バクテリアゲノムから所望の遺伝子を得る方法は、分子生物学の分野において普通であり且つ周知である。例えば遺伝子の配列が既知の場合、制限エンドヌクレアーゼ消化により適したゲノムライブラリを作り、所望の遺伝子配列に相補的なプローブを用いてスクリーニングすることができる。配列が単離されたら、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) (U. S. 4, 683, 202) のような標準的プライマー指向増幅法 (primer directed amplification methods) を用いてDNAを増幅し、適したベクターを用いる形質転換に適した量のDNAを得ることができる。

【0090】

あるいは又、ゲノムDNAの大きなセグメント (35~45 kb) がベクター中に詰込まれていることができるコスミドライブラリを作り、適した宿主の形質転換に用いることができる。コスミドベクターは大量のDNAを収容できる点で独特である。一般にコスミドベクターは、異種DNAの詰込み及び続く環状化に必要なcos DNA配列の少なくとも1つのコピーを有する。これらのベクターはcos配列の他に、ColE1のような複製起点及びアンピシリン又はネオマイシンに対して耐性の遺伝子のような薬剤耐性マーカーも含有しているであろう。適したバクテリア宿主の形質転換のためのコスミドベクターの使用法は、引用することによりその記載事項が本明細書の内容となるSambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Pressに十分に記載されている。

【0091】

典型的には、コスミドをクローニングするために、適した制限エンドヌクレアーゼを用いて異種DNAを単離し、コスミドベクターのcos領域に隣接して連結する。線状化された異種DNAを含有するコスミドベクターを次いでバクテリオファージのようなDNA詰込み伝達体と反応させる。詰込みプロセスの間にcos部位は切断され、異種DNAが細菌ウィルス粒子の頭部内に詰込まれる。次いでこれらの粒子を用いてE. コリのような適した宿主細胞をトランスフェクションする。細胞中に注入されると、異種DNAはcos付着末端の影響下で環状化する。この方法で異種DNAの大きなセグメントを導入し、組換え宿主細胞において発現させることができる。

グリセロールデヒドラターゼ (dhaB1、dhaB2及びdhaB3)、デヒドラターゼ再活性化因子 (orfZ及びorfX) ならびに1, 3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼ (dhaT) をコードする遺伝子の単離及びクローニング

本発明の範囲内でコスミドベクター及びコスミド形質転換法を用い、グリセロールを1, 3-プロパンジオールに処理 (processing) することができる遺伝子を保有していることが既知のバクテリア属から、ゲノムDNAの大きなセグメントをクローニングした。特定のには、K. ニューモニアエからのゲノムDNAを当該技術分野において周知の方法により単離し、コスミドベクターSupercos 1中への挿入のために制限酵素Sau3Aを用いて消化し、Gigapack II 詰込み抽出物を用いて詰込んだ。ベクターの構築に続き、コスミドDNAを用いてE. コリXL1-Blue MR細胞を形質転換した。グリセロールの存在下で細胞を成長させ、1, 3-プロパンジオール生成に関して培地を分析することにより、グリセロールを1, 3-プロパンジオールに転換する能力に関して形質転換細胞をスクリーニングした。

【0092】

1, 3-プロパンジオール陽性形質転換細胞の2つを分析し、コスミドをpK P1及びpK P2と命名した。DNA配列決定は、C. フレウンジイからのグリセロールデヒドラターゼ遺伝子への広範囲の相同性を明らかにし、これらの形質

転換細胞がグリセロールデヒドラターゼ遺伝子をコードするDNAを含有することを示した。他の1, 3-プロパンジオール陽性形質転換細胞を分析し、コスミドをpKP4及びpKP5と命名した。DNA配列決定は、これらのコスミドがジオールデヒドラターゼ遺伝子をコードするDNAを保有していることを明らかにした。

【0093】

本発明はクレブシエラコスミド内からの単離された遺伝子を使用しているが、デヒドラターゼ遺伝子及びデヒドラターゼ再活性化因子遺伝子の代替的供給源には、これらに限られるわけではないがシトロバクテル、クロスツリジア及びサルモネラが含まれる（表1を参照されたい）。

G3PDH及びG3Pホスファターゼをコードする遺伝子

本発明は宿主細胞におけるG3PDH及びG3Pホスファターゼ活性の発現に適した遺伝子を提供する。

【0094】

G3PDHをコードする遺伝子は既知である。例えばGPD1はサッカロミセスから単離され、配列番号：53に示す塩基配列を有しており、配列番号：54に示すアミノ酸配列をコードする（Wang et al., 同上）。同様に、GPD2によりコードされるG3PDH活性もサッカロミセスから単離されている（Eriksson et al., Mol. Microbiol. 17, 95 (1995)）。

【0095】

本発明の目的のために、NADH-依存性G3PDH活性を担うポリペプチドをコードするいずれの遺伝子も適していることが意図されており、ここでその活性はジヒドロキシアセトンリン酸（DHAP）のグリセロール-3-リン酸（G3P）への転換を触媒することができる。さらに、遺伝子DAR1、GPD1、GPD2、GPD3及びgpsAに対応する、NADH-依存性G3PDH'sのアミノ酸配列をコードするいずれの遺伝子も本発明において機能性であろうことが意図されており、ここでそのアミノ酸配列は酵素の機能を改変しないアミノ酸置換、欠失もしくは付加を包含していることができる。熟練者には、他の供給

源から単離されるG 3 P D Hをコードする遺伝子も本発明で用いるのに適しているであろうことがわかるであろう。G 3 P ホスファターゼをコードする遺伝子は既知である。例えばG P P 2はサッカロミセス・セレビスシアエから単離され、配列番号：55により示される塩基配列を有しており、それは配列番号：56に示されるアミノ酸配列をコードする (N o r b e c k e t a l. , J. B i o l. C h e m. 271, 13875 (1996))。

【0096】

本発明の目的のために、G 3 P ホスファターゼ活性をコードするいずれの遺伝子も方法において用いるのに適しており、ここでその活性はグリセロール-3-リン酸とH₂Oのグリセロールと無機リン酸塩への転換を触媒することができる。さらに、G 3 P ホスファターゼ酵素の機能を改変しないアミノ酸置換、欠失もしくは付加を包含するアミノ酸配列を含んで、遺伝子G P P 2及びG P P 1に対応するG 3 P ホスファターゼのアミノ酸配列をコードするいずれの遺伝子も本発明において機能性であろう。熟練者には、他の供給源から単離されるG 3 P ホスファターゼをコードする遺伝子も本発明で用いるのに適していることがわかるであろう。

宿主細胞

1, 3-プロパンジオールの組換え体生産のために適した宿主細胞は原核性又は真核性であることができ、1, 3-プロパンジオール経路のための活性な酵素を発現する宿主細胞の能力によってのみ制限されるであろう。適した宿主細胞はバクテリア、例えばシトロバクテル、エンテロバクテル、クロスツリジウム、クレブシエラ、アエロバクテル、ラクトバシルス、アスペルギルス、サッカロミセス、シゾサッカロミセス、チゴサッカロミセス、ピチア、クルイベロミセス、カンジダ、ハンセンラ、デバリオミセス、ムコル、トルロプシス、メチロバクテル、エシェリキア、サルモネラ、バシルス、ストレプトミセス及びシュードモナスであろう。本発明において好ましいのはE. コリ、E. ブラッタエ (E. b l a t t a e)、クレブシエラ、シトロバクテル及びアエロバクテルである。

【0097】

以下の一般的案を用いることにより、微生物を高力価1, 3-プロパンジオー

ル生産者に転換することができる。

【0098】

1. 1～2Mの1, 3-プロパンジオールの存在下で毒性量もしくは阻害量の3-HPAの定常状態濃度を可能にする内因性dhaT様活性の、宿主となる可能性のある生物中における存在を決定する。

【0099】

2. 宿主となる可能性のある生物中にそのような活性が存在したら、この活性を欠失させるか、もしくは不活性化するために適した突然変異誘発を行う。非機能性もしくは欠失したdhaT様活性の確証は、1～2Mの1, 3-プロパンジオールの存在下における3-HPA堆積がないことにより検出され得る。

【0100】

3. a) グリセロールが炭素源でない場合、グリセロール生産、b) グリセロールデヒドラターゼ及び付随する保持システムのための適した遺伝子ならびにc) yqhDを発現させる。

【0101】

ある微生物に関して払われる必要がある考慮は、1, 3-プロパンジオール生産のための条件下における内因性dhaT様酵素の発現もしくは抑制に関する。これらにはグリセロール、グルコース又は嫌気性(anaerobiosis)の存在も含まれる。

ベクター及び発現カセット

本発明は、G3PDH、G3Pホスファターゼ、デヒドラターゼ及びデヒドラターゼ再活性化因子の適した宿主細胞中へのクローニング、形質転換及び発現に適した多様なベクターならびに形質転換及び発現カセットを提供する。適したベクターは用いられる微生物と適合性のものである。例えばバクテリア、ウイルス(例えばバクテリオファージT7又はM-13由来ファージ)、コスミド、酵母又は植物から適したベクターを誘導することができる。そのようなベクターを得、用いるための案は当該技術分野における者に既知である(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual-volumes 1, 2, 3 (Cold Spring

Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY, 1989))。

【0102】

典型的には、ベクター又はカセットは適した遺伝子の転写及び翻訳を支配する配列、選択マーカー及び自律複製又は染色体組込みを可能にする配列を含有する。適したベクターは転写開始調節を宿している遺伝子の領域5'及び転写の終結を調節するDNAフラグメントの領域3'を含む。両調節領域が、形質転換される宿主細胞に同種である遺伝子に由来する場合に最も好ましい。そのような調節領域は生産宿主として得られる特定の種に本来の(native)遺伝子に由来する必要はない。

【0103】

所望の宿主細胞中におけるG3PDH及びG3Pホスファターゼ遺伝子(それぞれDAR1及びGPP2)の発現を推進するのに有用な開始調節領域又はプロモーターは多数であり、当該技術分野における熟練者に良く知られている。これらの遺伝子を推進できる実質的にいずれのプロモーターも本発明に適しており、CYC1、HIS3、GAL1、GAL10、ADH1、PGK、PHO5、GAPDH、ADC1、TRP1、URA3、LEU2、ENO及びTPI(サッカロミセス中における発現に有用)；AOX1(ピチア中における発現に有用)；ならびにlac、trp、 λP_L 、 λP_R 、T7、tac及びtrc(E. コリ中における発現に有用)が含まれるがこれらに限られない。

【0104】

終結調節領域も好ましい宿主に本来の種々の遺伝子に由来し得る。場合により終結部位は不必要であり得る；しかしながら含まれるとしたらそれが最も好ましい。

【0105】

本酵素の有効な発現のために、発現が適したメッセンジャーRNAの形成を生ずるように、酵素をコードするDNAを開始コドンを通して選ばれた発現調節領域に操作可能に結合させる。

【0106】

本発明において特に有用なのはベクター p D T 2 9 及び p K P 3 2 であり、それらは p A H 4 8 と一緒に用いられるように設計されている。p D T 2 9 及び p K P 3 2 の本質的要素はクレブシエラ・ニューモニアエから単離された d h a レギュロンに由来する。p D T 2 9 は、その配列が配列番号：1 内に含有されているヌクレオチドである読取り枠 d h a R、o r f Y、d h a T、o r f X、o r f W、d h a B 1、d h a B 2 及び d h a B 3 を含有する。p K P 3 2 は同じ供給源からの、p D T 2 9 上に存在すると同じ読取り枠の組を含有し、p K P 3 2 には d h a T が欠けていることが異なる。p A H 4 8 は宿主細胞中に D A R 1 及び G P P 2 遺伝子を導入するために用いられる伝達体であり、さらに特定のにはサッカロミセス・セレビシアエから単離される D A R 1 及び G P P 2 遺伝子を含む。

1, 3-プロパンジオールの生産のための適した宿主の形質転換及び遺伝子の発現

適したカセットが構築されると、それらは適した宿主細胞の形質転換に用いられる。G 3 P D H、G 3 P ホスファターゼ、デヒドラターゼ及びデヒドラターゼ再活性化因子をコードする遺伝子を含有するカセットの宿主細胞中への導入は既知の方法により、例えば形質転換（例えばカルシウム透過細胞（c a l c i u m - p e r m e a b i l i z e d c e l l）、エレクトロポレーションを用いる）により、あるいは組換えファージウィルスを用いるトランスフェクションにより行うことができる（S a m b r o o k e t a l., 同上）。

【0107】

本発明においては、一般的方法及び実施例に十分に記載する通り、カセットを用いて E. コリを形質転換した。

突然変異体

本方法が、例示する細胞の他に、1, 3-プロパンジオールの生産を増強するように特別に設計された1つもしくは複数の突然変異を有する細胞を利用できるであろうことが意図されている。通常は炭素供給材料を非一生産的経路に転じるか、あるいは有意なカタボライト抑制を示す細胞を、これらの表現型の欠点（p h e n o t y p i c d e f i c i e n c i e s）を避けるように突然変異させ

ることができた。例えば多くの野生型細胞は培地中のグルコース及び副産物からのカタボライト抑制を受け易く、グルコース抑制に対して耐性である1, 3-プロパンジオール生産の可能なこれらの野生型生物の突然変異株が本発明において特に有用であろうことが意図されている。

【0108】

突然変異体を作る方法は当該技術分野において普通且つ周知である。例えば野生型細胞を放射線又は化学的突然変異原のような多様な作因に暴露し、次いで所望の表現型に関してスクリーニングすることができる。放射線を介して突然変異を作る場合、紫外(UV)又は電離線を用いることができる。遺伝子突然変異のために適した短波UV波長は200nm～300nmの範囲内に含まれ、254nmが好ましいであろう。この波長内のUV線は主にグアニジン及びシトシンからアデニン及びチミジンまでの核酸配列内で変化を引き起こす。すべての細胞はほとんどのUV誘導突然変異を修復するDNA修復機構を有しているので、修復プロセスを中断させて有効な突然変異の数を最大にするためにカフェイン及び他の阻害剤のような試薬を加えることができる。300nm～400nm領域内の光を用いる長波UV突然変異も可能であるが、一般にDNAと相互作用するプソラレン染料のような種々の活性化剤と一緒に用いないと短波UV光程有効でない。化学的薬剤を用いる突然変異誘発も突然変異体の形成に有効であり、通常用いられる物質には非複製DNAに影響する化学品、例えばHNO₂及びNH₂OHならびに複製DNAに影響する薬剤、例えばフレームシフト突然変異を引き起こすことで注目され得るアクリジン染料が含まれる。放射線又は化学的薬剤を用いて突然変異体を作るための特定的方法は当該技術分野において十分に実証されている。例えば引用することによりその記載事項が本明細書の内容となるThomas D. Brock in Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, Second Edition (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, M. A. 又はDeshpande, Mukund V., Appl. Biochem. Biotechnol. 36, 227 (1992)を参照されたい。

【0109】

突然変異誘発が起こった後、所望の表現型を有する突然変異体を種々の方法により選択することができる。所望の産物もしくは中間体を生産する能力に関して突然変異誘発された細胞を選択する場合、ランダムスクリーニングが最も普通である。あるいは又、突然変異誘発された集団を耐性のコロニーのみが成長できる選択培地上で成長させることにより、突然変異体の選択的単離を行うこともできる。突然変異体選択の方法は高度に開発され、且つ工業的微生物学の分野において周知である。例えばBrock, 同上; DeMancilha et al., Food Chem. 14, 313 (1984) を参照されたい。

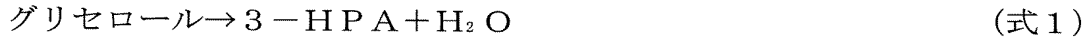
【0110】

望ましくない酵素活性の除去も酵素をコードする遺伝子の破壊により行うことができる。そのような方法は当該技術分野における熟練者に既知であり、実施例4及び実施例8で例示する。

1. 3-プロパンジオール生産経路における改変

代表的酵素経路。 グルコースからの1, 3-プロパンジオールの生産は以下の系列の段階により行われ得る。この系列は当該技術分野における熟練者に既知の複数の経路の代表であり、図5に示されている。1系列の段階においてグルコースが解糖経路の酵素によりジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) と3-ホスホグリセルアルデヒド (3-PG) に転換される。次いでDHAPのジヒドロキシアセトン (DHA) への加水分解及び続く還元あるいはDHAPのグリセロール3-リン酸 (G3P) への還元及び続く加水分解によりグリセロールが生成する。加水分解段階は、それらの基質に関して非一特異的であることが知られているいずれかの数の細胞ホスファターゼにより触媒され得るか、あるいは組換えにより活性を宿主中に導入することができる。還元段階は NAD^+ (又は NADP^+) 結合宿主酵素により触媒され得るか、あるいは組換えにより宿主中に活性を導入することができる。dhaレギュロンが式3の可逆的反応を触媒するグリセロールデヒドロゲナーゼ (E. C. 1. 1. 1. 6) を含有することは注目値する。

【0111】



上記で詳細に記載した通り、グリセロールは中間体3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド(3-HPA)を介して1, 3-プロパンジオールに転換される。中間体3-HPAは宿主によりコードされ得るか、又は組換えにより宿主中に導入され得るデヒドラターゼ酵素によりグリセロールから生産される、式1。このデヒドラターゼはグリセロールデヒドラターゼ(E. C. 4. 2. 1. 30)、ジオールデヒドラターゼ(E. C. 4. 2. 1. 28)又はこの変換を触媒することができる他のいずれかの酵素であることができる。グリセロールデヒドラターゼはd h a レギュロンによりコードされるが、ジオールデヒドラターゼはコードされない。1, 3-プロパンジオールは NAD^+ (もしくは NADP^+) 結合宿主酵素により3-HPAから生産されるか、あるいは組換えにより活性を宿主中に導入することができる、式2。1, 3-プロパンジオールの生産におけるこの最終的反応は1, 3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼ(E. C. 1. 1. 1. 202)又は他のアルコールデヒドロゲナーゼにより触媒され得る。

炭素チャンネリングに影響する突然変異及び形質転換。 1, 3-プロパンジオール生産経路における変異を含む多様な突然変異微生物が本発明において有用であろう。例えばトリオースリン酸イソメラーゼ突然変異(t p i -)の本発明の微生物中への導入は、炭素チャンネリングにより性能を向上させるための突然変異の利用の例である。トリオースリン酸イソメラーゼはDAH Pの3-ホスホグリセルアルデヒドへの転換を担う酵素であり、そのままではグルコースからグリセロール及び1, 3-プロパンジオールへの主経路からの炭素の流れの分岐を許す(図5)。かくして欠失突然変異(t p i -)は当該技術分野において記載されている効率を越えて所望の経路の全体的代謝効率を増強する。同様に、1, 3-プロパンジオール生産経路の中間体に関する別の経路を遮断する突然変異も本発明にとって有用であろう。例えばグリセロールキナーゼの除去はG 3 Pホスファターゼの作用によりG 3 Pから生成するグリセロールがA T Pを失ってG 3 Pに再-転換されるのを妨げる(図5)。又、グリセロールデヒドロゲナーゼ(例え

ば *g l d A*) の除去は、*NADH*-依存性グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼの作用により *DHAP* から生成するグリセロールがジヒドロキシアセトンに転換されるのを妨げる (図5)。突然変異を構造遺伝子に向け、酵素活性の活性を損なうか、もしくは向上させることができるか、あるいはプロモーター領域及びリボソーム結合部位を含むを含む調節遺伝子に向け、酵素活性の発現レベルを調節することができる。

【0112】

かくして形質転換及び突然変異を組合わせ、1, 3-プロパンジオール生産の増強のために特定の酵素活性を調節することが意図されている。かくして1, 3-プロパンジオールの生産を向上させる全細胞触媒の修正を予定する (*anticipate*) ことは本発明の範囲内である。

【0113】

本発明は、炭素の流れがグルコースから *DHAP*、*G3P*、グリセロール、3-*HPA* 及び最終的に1, 3-プロパンジオールに動く、糖基質からの1, 3-プロパンジオールの生産のための好ましい経路を利用する。本生産株は、炭素の非生産的化合物への分岐を妨げる種々の欠失突然変異を導入することにより、経路の代謝効率を最大にするように操作されている。上記の通りグリセロールは、グリセロールデヒドロゲナーゼ又はグリセロールキナーゼを介する *DHA* 又は *G3P* への変換により、3-*HPA* への転換から分岐させられ得る (図5)。従って、本生産株は *g l d A* 及び *g l p K* 遺伝子における欠失突然変異を含有する。同様に、*DHAP* はトリオースリン酸イソメラーゼによって3-*PG* に分岐させられ得、かくして本生産微生物はこの遺伝子における欠失突然変異も含有する。本方法にはさらにグリセロールの3-*HPA* への転換のためのデヒドラターゼ酵素も導入され、それは *d h a* レギュロンの *o r f X* 及び *o r f Z* によりコードされる再活性化因子と共同して機能する (図5)。3-*HPA* の1, 3-プロパンジオールへの転換は典型的には1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼを介して行われるが、本方法は最終的産物である1, 3-プロパンジオールのより高い力価及び収率を与える非特異的触媒活性を利用する (図5)。そのような方法では、200 g/L の力価が期待される場合に少なくとも10 g/L の1, 3

ープロパンジオールの力価が達成される。

【0114】

あるいは又、1，3ープロパンジオール生産のための改良法は基質としてグリセロール又はジヒドロキシアセトンを利用することができ、その場合経路は最後の3つの基質、グリセロール→3HPA→1，3ープロパンジオールのみを含む。そのような方法では、非ー特異的触媒活性（アルコールデヒドロゲナーゼであることが予測される）が支持されてオキシドレダクターゼがやはり排除されるが、欠失突然変異の必要は、培養にグリセロールを加えることのエネルギーの考慮により取り消される。そのような方法では、200g/Lの力価が期待される場合に少なくとも71g/Lの1，3ープロパンジオールの力価が達成される。

【0115】

同様に、改良された1，3ープロパンジオール生産者を作るために、dhaT活性の欠失又は突然変異により修正されている野生型微生物の突然変異体を提供することは、本発明の範囲内である。例えば自然にはdhaレギュロンのすべての要素を含有する微生物を操作し、1，3ープロパンジオールオキシドレダクターゼ活性をコードするdhaT遺伝子を不活性化することができる。これらの微生物は、アルコールデヒドロゲナーゼであることが予測される内因性触媒活性の存在により媒介され、1，3ープロパンジオールのより高い収率及び力価を与えるであろうことが予測される。そのような微生物の例にはクレブシエラ種、シトロバクテル種及びクロスツリジウム種が含まれるがこれらに限られない。

培地及び炭素基質

本発明における発酵培地は適した炭素基質を含有しなければならない。適した基質には単糖類、例えばグルコース及びフルクトース、オリゴ糖類、例えばラクトース又はスクロース、多糖類、例えば澱粉又はセルロースあるいはそれらの混合物ならびに再生可能な供給材料、例えばチーズホエー透過物、コーンスティープリカー（cornsteep liquor）、てんさいの糖みつ及び大麦の麦芽からの非精製混合物が含まれ得るがこれらに限られない。さらに炭素基質は1ー炭素基質、例えば二酸化炭素又はメタノールであることもでき、それに関しては重要生化学的中間体への代謝的転換が示されている。1炭素源（例えばメタ

ノール、ホルムアルデヒド又はギ酸塩)からのグリセロール生産はメチロトロフイースト (*methylo trophic yeasts*) (K. Yamada et al., *Agric. Biol. Chem.* 53 (2), 541-543 (1989)) 及びバクテリア (Hunter et al., *Biochemistry* 24, 4148-4155 (1985)) において報告されている。これらの微生物はメタンからギ酸塩までの酸化状態における範囲の1炭素化合物を同化し、グリセロールを生産することができる。炭素同化の経路はリブローズーリン酸を介するか、セリンを介するか、あるいはキシルローズーリン酸を介するものであることができる (Gottschalk, *Bacterial Metabolism, Second Edition*, Springer-Verlag: New York (1986))。リブローズーリン酸経路は、6-炭素糖を生成するギ酸塩とリブローズー5-リン酸との縮合を含み、6-炭素糖はフルクトース及び結局は3-炭素産物であるグリセルアルデヒド-3-リン酸となる。同様に、セリン経路は1-炭素化合物をメチレンテトラヒドロフォレートを紹介して解糖経路中に同化する。

【0116】

1及び2炭素基質の他に、メチロトロフ微生物は複数の他の炭素-含有化合物、例えばメチルアミン、グルコサミン及び多様なアミノ酸を代謝活性のために使用することも知られている。例えばメチロトロフ酵母はメチルアミンからの炭素を使用してトレハロース又はグリセロールを生成させることが知られている (Bellion et al., *Microb. Growth C1 Compd.*, [Int. Symp.], 7th (1993), 415-32. Editor(s): Murrell, J. Collin; Kelly, Don P. Publisher: Intercept, Andover, UK)。同様に、カンジダの種々の種はアラニン又はオレイン酸を代謝するであろう (Sulter et al., *Arch. Microbiol.* 153 (5), 485-489 (1990))。従って、本発明で使用される炭素の源は多様な炭素-含有基質を含むことができ、微生物又はプロセスの選択のみによって制限されるであろうことが意図されている。

【0117】

上記で挙げた炭素基質及びそれらの混合物（共一供給材料）のすべてが本発明において適していることが意図されているが、好ましい炭素基質は、プロセスが内因性グリセロールを生産することを目的としている場合はグルコース、フルクトース、スクロース又はメタノールであり、プロセスがグリセロール又はジヒドロキシアセトン供給材料を予定している場合はグリセロール又はジヒドロキシアセトンである。

【0118】

発酵培地は、適した炭素源の他に適した無機物、塩、補因子、緩衝剤及び当該技術分野における熟練者に既知の、培養物の成長及び1, 3-プロパンジオール生産のために必要な酵素経路の促進に適した他の成分を含有しなければならない。Co (I I) 塩及び／又はビタミンB₁₂ 又はそれらの前駆体が特に注目される。

【0119】

アデノシルーコバラミン（補酵素B₁₂）はデヒドラターゼ活性のために必須の補因子である。補酵素B₁₂の合成は原核生物、例えばエシェリキア・ブラッタエ、クレブシエラ種、シトロバクテル種及びクロスツリジウム種において見いだされ、そのいくつかは初めから該化合物を合成することができ、他は部分的反応を行うことができる。例えばE. コリはコリン環構造を組み立てることができないが、コビンアミドのコリノイドへの転換を触媒することができ、5'-デオキシアデノシル基を導入することができる。かくしてE. コリ発酵においては補酵素B₁₂ 前駆体、例えばビタミンB₁₂ を与えることが必要であることが当該技術分野において既知である。

【0120】

E. コリ発酵へのビタミンB₁₂ 添加物は連続的に、一定の速度で、又は細胞塊の生成と符合するように段階的に（s t a g e d）加えることができるか、あるいは1つの、もしくは複数のボラス添加物として加えることができる。細胞塊（OD 550）に供給されるビタミンB₁₂（mg）の好ましい比率は0.06～0.60である。細胞塊（OD 550）に供給されるビタミンB₁₂（mg）の最

も好ましい比率は0.12～0.48である。

【0121】

本発明の形質転換されたE. コリにはビタミンB₁₂ が加えられるが、初めからB₁₂ を生合成できる他の微生物も適した生産細胞であり、これらの微生物へのB₁₂ の添加は不必要であろうことが意図されている。

培養条件：

典型的には、適した培地中において35℃で細胞を成長させる。本発明における好ましい成長培地は普通の商業的に調製される培地、例えばLuria Bertani (LB) ブイヨン、Sabouraud Dextrose (SD) ブイヨン又はYeast培地 (YM) ブイヨンである。他の限定された (defined)、又は合成の成長培地も用いることができ、特定の微生物の成長に適した培地は微生物学又は発酵科学の技術分野における熟練者に既知であろう。カタボライト抑制を直接もしくは間接的に調節することが知られている薬剤、例えばサイクリックアデノシン2' : 3' -リン酸の使用を反応培地中に導入することもできる。同様に、1, 3-プロパンジオール生産の増強に導く酵素活性を調節することが知られている薬剤 (例えばメチルビオローゲン) の使用を遺伝子操作と一緒に、もしくはその代りに用いることができる。

【0122】

発酵のために適したpH範囲はpH5.0～pH9.0であり、pH6.0～pH8.0が初期条件として好ましい。

【0123】

反応は好氣的もしくは嫌氣的条件下で行うことができ、嫌氣的もしくは微好氣的条件が好ましい。

【0124】

制限された、もしくは過剰の炭素供給材料、例えばグルコースを用いてフェド-バッチ発酵を行うことができる。

バッチ及び連続発酵：

本プロセスは発酵のバッチ法を用いる。古典的なバッチ発酵は、培地の組成が発酵の開始時に設定され、発酵の間に人工的な改変に合わない閉鎖系である。か

くして発酵の開始時に培地に所望の1種もしくは複数種の微生物を接種し、系に何も加えずに発酵を起こさせる。しかしながら、典型的には「バッチ」発酵は炭素源の添加に関するバッチであり、多くの場合、pH及び酸素濃度のような因子の制御における試みが成される。バッチ系では、系の代謝産物及びバイオマス組成が発酵が止められる時点まで一定に変化する。バッチ培養内では、細胞が静的誘導期を介して高成長対数期に、そして最後に成長速度が減じるか又は止まる定常期に加減する (moderate)。処理されないと、定常期における細胞は終局的に死ぬであろう。対数期における細胞は一般に最終的産物もしくは中間体の生産の大部分を担う。

【0125】

標準的バッチ系への変法がフェドーバッチ系である。フェドーバッチ発酵法も本発明において適しており、発酵の進行と共に基質を増加させて加えることを除いて、典型的なバッチ系を含んでいる。フェドーバッチ系は、カタボライト抑制が細胞の代謝を阻害する傾向がある場合、及び培地中に限られた量の基質があることが望ましい場合に有用である。フェドーバッチ系における実際の基質濃度の測定は困難であり、従って測定可能な因子、例えばpH、溶解酸素及びCO₂のような廃ガスの分圧の変化に基づいて見積もられる。バッチ及びフェドーバッチ発酵は当該技術分野において普通且つ周知であり、Brook, 同上に例を見いだすことができる。

【0126】

本発明はバッチ様式で行われるが、該方法を連続発酵法に適応させ得ることが意図されている。連続発酵は、限定された発酵培地がバイオリアクターに連続的に加えられ、等量の条件調節された培地 (conditioned media) が処理のために同時に取り出される開放系である。連続発酵は一般に、細胞が主に対数期成長にある一定の高い密度に培養を保持する。

【0127】

連続発酵は、細胞成長又は最終的産物濃度に影響する1つの因子もしくはいくつかの因子の調節を可能にする。例えば1つの方法は炭素源又は窒素レベルのような制限栄養素を固定された比率に保持し、他のすべてのパラメーターの加減を

許すであろう。他の系では、培地の濁度により測定される細胞濃度を一定に保ちながら、成長に影響する複数の因子を連続的に変えることができる。連続系は定常状態成長条件を保持するように努め、かくして培地が取り出される故の細胞の損失を発酵における細胞成長速度に対して釣り合わせねばならない。連続発酵法のための栄養素及び成長因子の調節の方法ならびに産物生成の速度を最大にするための方法は工業的微生物学の技術分野において周知であり、多様な方法がBroock, 同上に詳細に記載されている。

【0128】

本発明をバッチ、フェドバッチ又は連続法を用いて実行できること、ならびに発酵のいずれの既知の様式も適していることが意図されている。さらに、細胞を全細胞触媒として基質上に固定化し、1, 3-プロパンジオール生産のための発酵条件に供することができることが意図されている。

1, 3-プロパンジオールの同定及び精製：

発酵培地からの1, 3-プロパンジオールの精製法は当該技術分野において既知である。例えば有機溶媒を用いる抽出、蒸留及びカラムクロマトグラフィーに反応混合物を供することにより、細胞培地からプロパンジオールを得ることができる(U. S. 5, 356, 812)。この方法のために特に優れた有機溶媒はシクロヘキサンである(U. S. 5, 008, 473)。

【0129】

培地を高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)分析にかけることにより、1, 3-プロパンジオールを直接同定することができる。本発明において好ましいのは、無勾配様式で0.01N硫酸の移動相を用いる分析的イオン交換カラム上で発酵培地を分析する方法である。

【0130】

【実施例】

一般的方法

リン酸化、連結及び形質転換のための方法は当該技術分野において周知である。以下の実施例において用いるのに適した方法は、Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory

Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に見いだされ得る。

【0131】

バクテリア培養の保持及び成長に適した材料及び方法は当該技術分野において周知である。以下の実施例において用いるのに適した方法は、Manual of Methods for General Bacteriology (Phillipp Gerhardt, R. G. E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg and G. Briggs Phillips, eds), American Society for Microbiology, Washington, D. C. (1994) 又は Thomas D. Brock in Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, Second Edition (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MAに見いだされ得る。バクテリア細胞の成長及び保持のために用いられるすべての試薬及び材料は、他にことわらない限り Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI), DIFCO Laboratories (Detroit, MI)、GIBCO/BRL (Gaithersburg, MD) 又は Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) から得た。

【0132】

略字の意味は以下の通りである：「h」は単数もしくは複数の時 (hours) を意味し、「min」は単数もしくは複数の分を意味し、「sec」は単数もしくは複数の秒を意味し、「d」は単数もしくは複数の日を意味し、「mL」はミリリットルを意味し、「L」はリットルを意味し、50 amp は mL 当りに 50 μ g のアンピシリンを意味し、LB-50 amp は mL 当りに 50 μ g のアンピシリンを含有する Luria-Bertani ブイヨン を意味する。

【0133】

表中で以下の略字を用いる。「Con.」は転換率であり、「Sel.」は炭

素に基づく選択率であり、「n d」は検出されないである。

【0134】

以下の実施例において用いられる、及び構築される株及びベクターを下記のチャートに挙げる：

【0135】

【表2】

株/プラスミド	欠失	ORF/遺伝子
KLP23	<i>gldA</i> <i>glpK</i>	
RJ8m	<i>gldA</i> <i>glpK</i> <i>Tpi</i>	
pAH48		GPP2 DAR1
pDT29		<i>dhaR</i> <i>orfY</i> <i>dhaT</i> <i>orfX</i> <i>orfW</i> <i>dhaB1</i> <i>dhaB2</i> <i>dhaB3</i> <i>orfZ</i>
pKP32		<i>dhaR</i> <i>orfY</i> <i>orfX</i> <i>orfW</i> <i>dhaB1</i> <i>dhaB2</i> <i>dhaB3</i> <i>orfZ</i>

【0136】

酵素アッセイ

デヒドラターゼ酵素に関するアッセイ：

グリセロール又は1，2-プロパンジオールを基質として用いて無細胞抽出物中のデヒドラターゼ活性を決定した。典型的には、フレンチプレス及び続いて細胞デブリスの遠心を用いる細胞破壊により無細胞抽出物を調製した。アルデヒドのメチルベンゾー2-チアゾロンヒドラゾンとの反応に基づくアッセイはF

orage and Foster (Biochim. Biophys. Acta 569, 249 (1979)) に記載されている。

【0137】

Honda et al. (J. Bacteriol. 143, 1458 (1980)) は、デヒドラターゼの再活性化を測定するアッセイを開示している。デヒドラターゼ活性はトルエン処理された全細胞において、ATPを用いて、及び用いずに、グリセロール又は1, 2-プロパンジオールを基質として用いて決定された。ATPを添加した産物生成対ATPを添加しない産物生成の比率により再活性化を決定した。産物生成（グリセロール又は1, 2-プロパンジオールを基質として用いる場合のそれぞれ3-HPA又はプロビオンアルデヒド）をHPLCを用いて直接、あるいはメチルベンゾ-2-チアゾロンヒドラゾン試薬を用いて間接的に測定した。あるいは又、NADH結合アルコールデヒドロゲナーゼを用いるアルデヒドのそのそれぞれのアルコールへの転換をカップリングさせ、NADHの消失を監視することにより、産物生成を決定した。

1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼに関するアッセイ：

1, 3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼと呼ばれることもある1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼの活性を、記載されている通りに (Johnson and Lin, J. Bacteriol. 169, 2050 (1987))、溶液中又はスラブゲル中で無細胞抽出物に関し、1, 3-プロパンジオール及び NAD^+ を基質として用いて決定した。あるいは又、NADHの消失により3-HPAとNADHの1, 3-プロパンジオールと NAD^+ への転換を決定した。スラブゲルアッセイは、サイズ分離のおかげで、1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ (dhaT) の活性を非特異的アルコールデヒドロゲナーゼの活性と分離するという利点の可能性を有する。シトロバクテル・フレンジイ、クレブシエラ・ニューモニアエ及びクロスツリジウム・パステウリアヌムからの1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ (dhaT) の本来の分子量は異常に大きく、330,000~440,000ダルトンの大きさである。ラクトバシルス・ブレビス及びラクトバシルス・ブクネリは、既知の1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ (dhaT) の性質に類似の性質

を有するデヒドラターゼ関連1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼを含有する。

グリセロール3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性に関するアッセイ：

Beil et al. (J. Biol. Chem. 250, 7153 (1975)) により公開されている方法からの下記で修正する方法を用いた。この方法は、5 mM DTTを含む0.1 M Tris/HCl、pH 7.5 緩衝液中に0.2 mM NADH、2.0 mM ジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) 及び酵素を含有するキュベット中で、1.0 mLの合計容積において30℃で無細胞抽出物試料をインキュベーションすることを含んだ。最初に酵素とNADHの反応のバックグラウンド速度を340 nmにおいて少なくとも3分間決定した。続いて第2の基質であるDHAPを加え、時間を経た吸収の変化をさらに少なくとも3分間監視した。総速度からバックグラウンド速度を引き去ることによりG3PDH活性を限定した。

グリセロール-3-ホスファターゼ活性に関するアッセイ：

ビス-Tris又はMES及びマグネシウム緩衝液、pH 6.5 中で抽出物を有機ホスフェート基質と一緒にインキュベーションすることにより酵素活性に関するアッセイを行った。用いられた基質は1- α -グリセロールリン酸又はd, 1- α -グリセロールリン酸であった。アッセイにおける試薬の最終的濃度は：緩衝液 (20 mM、ビス-Tris又は50 mM MES) ; MgCl₂ (10 mM) ; 及び基質 (20 mM) である。試料中の合計タンパク質が低く、酸クエンチを用いて可視の沈殿が起こらない場合、キュベット中で簡単に試料をアッセイした。この方法は、20 mM 基質 (50 μ L、200 mM)、50 mM MES、10 mM MgCl₂、pH 6.5 緩衝液を含有するキュベット中で酵素試料をインキュベーションすることを含んだ。最終的ホスファターゼアッセイ容積は0.5 mLであった。酵素-含有試料を反応混合物に加え；キュベットの内容物を混合し、次いでキュベットをT = 37℃で5～120分間、循環水浴中に入れ、時間の長さは酵素試料におけるホスファターゼ活性が2～0.02 U/mLのどの範囲であるかに依存した。酸モリブデート試薬 (0.4 mL) の添加により酵素反応をクエンチングした。Fiske Subbaw試薬 (0.1

mL) 及び蒸留水 (1.5 mL) を加えた後、溶液を混合し、発色させた。完全に発色させるために10分の後、Cary 219 UV/可視分光光度計を用いて試料の吸収を660 nmで読んだ。無機リン酸塩原液 (0.65 mM) を用い、0.026 ~ 0.130 μ mol/mL の範囲の最終的無機リン酸塩濃度を有する6つの標準を調製することにより作られた標準曲線に、放出された無機リン酸塩の量を比較した。

グリセロールキナーゼ活性に関するアッセイ:

適した量の酵素、典型的には無細胞粗抽出物を、40 mM ATP、20 mM $MgSO_4$ 、21 mM の均一に¹³C 標識されたグリセロール (99%、Cambridge Isotope Laboratories) 及び0.1 M Tris-HCl、pH 9 を含有する反応混合物に、25℃で75分間加えた。

¹³C-NMR (125 MHz) によりグリセロールのグリセロール3-リン酸への転換を検出した: グリセロール (63.11 ppm, δ , $J=41$ Hz 及び72.66 ppm, t , $J=41$ Hz); グリセロール3-リン酸 (62.93 ppm, δ , $J=41$ Hz; 65.31 ppm, $br\ d$, $J=43$ Hz; 及び72.66 ppm, dt , $J=6, 41$ Hz)。

NADH-結合グリセロールデヒドロゲナーゼアッセイ:

E. コリ株からの無細胞抽出物中のNADH-結合グリセロールデヒドロゲナーゼ活性 (gldA) を、非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるタンパク質分離の後に決定した。グリセロールと NAD^+ のジヒドロキシアセトンとNADHへの転換を、フェナジンメトサルフェート (PMS) を媒介物として用い、3-[4,5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド (MTT) の濃く着色したホルマザンへの転換とカップリングさせた (Tang et al., J. Bacteriol. 140, 182 (1997))。

【0138】

電気泳動は、未変性ゲル (Novex, San Diego, CAからの8 ~ 16% TG、1.5 mm、15レーンゲル) を用いて標準的方法により、二重に行われた。50 mM Tris 又は炭酸カリウム緩衝液、pH 9 を用いて10

分間、3回洗浄することにより、残留グリセロールをゲルから除去した。50 mM Tris 又は炭酸カリウム、pH 9、60 mg 硫酸アンモニウム、75 mg NAD^+ 、1.5 mg MTT 及び 0.5 mg PMS を含有する 15 mL のアッセイ溶液中で、グリセロール（約 0.16 M の最終的濃度）を含む、及び含まない 2 重のゲルを展開（developed）した。

【0139】

ポリアクリルアミドゲル電気泳動に続き、精製された K. ニューモニアエグリセロールデヒドロゲナーゼ（dhad）に対して誘起されたポリクローナル抗体との反応により、E. コリ株中の NADH-結合グリセロールデヒドロゲナーゼ活性（gladA）の存在又は不在も決定した。

1, 3-プロパンジオールの単離及び同定：

HPLC によりグリセロールの 1, 3-プロパンジオールへの転換を監視した。分析は標準的方法及びクロマトグラフィーの技術分野における熟練者に利用可能な材料を用いて行われた。1つの適した方法は、UV（210 nm）及び RI 検出を用いる Waters Maxima 820 HPLC システムを使用した。Shodex SH-1011P プレカラム（6 mm x 50 mm）が備えられ、50℃で温度制御された Shodex SH-1011 カラム（8 mm x 300 mm、Waters, Milford, MA から購入）上に、移動相として 0.01 N H_2SO_4 を用い、0.5 mL/分の流量で試料を注入した。定量的分析が望まれている場合、外部標準として既知量のトリメチル酢酸を用いて試料を調製した。典型的には、グルコース（RI 検出）、グリセロール、1, 3-プロパンジオール（RI 検出）及びトリメチル酢酸（UV 及び RI 検出）の保持時間は、それぞれ 15.27 分、20.67 分、26.08 分及び 35.03 分であった。

【0140】

GC/MS により 1, 3-プロパンジオールの生産を確認した。分析は標準的方法及び GC/MS の技術分野における熟練者に利用可能な材料を用いて行われた。1つの適した方法は、Hewlett Packard 5971 Series 質量選択的検出器（EI）及び HP-INNOWax カラム（長さ 30 m

、内径0.25mm、フィルム厚さ0.25ミクロン)に連結されたHewlett Packard 5890 Series IIガスクロマトグラフを用いた。生成した1,3-プロパンジオールの保持時間及び質量スペクトルを基準の1,3-プロパンジオール (m/e : 57, 58)のそれに比較した。

【0141】

GC/MSのための代替りの方法は試料の誘導体化を含んだ。1.0mLの試料(例えば培養上澄み液)に30 μ Lの濃(70%v/v)過塩素酸を加えた。混合の後、試料を凍結乾燥した。ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド:ピリジンの1:1混合物(300 μ L)を凍結乾燥された材料に加え、激しく混合し、65℃において1時間置いた。遠心により不溶性材料を除いて試料を透明にした。得られる液体は2相に分かれ、その上の方を分析に用いた。試料をDB-5カラム(48m、内径0.25mm、フィルム厚さ0.25 μ m; J&W Scientificから)上でクロマトグラフィーにかけ、培養上澄み液から得た1,3-プロパンジオール誘導体の保持時間及び質量スペクトルを基準の標準試料から得たそれに比較した。TMS-誘導体化1,3-プロパンジオールの質量スペクトルは205、177、130及び115AMUの特徴的イオンを含有する。

細胞ライシス:

発酵ブイオン中の細胞外可溶性タンパク質濃度を測定することにより、細胞ライシスを見積もった。細胞を分離するために、発酵槽試料を卓上遠心機において遠心した(典型的には、Eppendorf, Model 5415C 微量遠心機において12,000rpmで3~5分)。得られる上澄み液を商業的に入手可能な試薬を用い、Bradford法によってタンパク質濃度に関して分析した(Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, Hercules, CA)。

生存率:

発酵槽から得た細胞を、非一選択的LB寒天平板上で、適した希釈において平板培養することにより、細胞生存率を決定した。発酵槽ブイオンのmL当たりの生存細胞をOD550(AU)で割った比率を用いることにより、発酵槽実験の

間で細胞生存率を比較した。

【0142】

実施例 1

1, 3-プロパンジオールの発現のためのコスミドDNAを用いる

E. コリ宿主細胞のクローニング及び形質転換

培地：

1, 3-プロパンジオールを生産する能力に関するバクテリア形質転換細胞のスクリーニングにおいて、合成S12培地を用いた。S12培地は：10mM 硫酸アンモニウム、50mM リン酸カリウム緩衝液、pH7.0、2mM $MgCl_2$ 、0.7mM $CaCl_2$ 、50 μ M $MnCl_2$ 、1 μ M $FeCl_3$ 、1 μ M $ZnCl$ 、1.7 μ M $CuSO_4$ 、2.5 μ M $CoCl_2$ 、2.4 μ M Na_2MoO_4 及び2 μ M チアミン塩酸塩を含有する。

【0143】

成長及び発酵のために用いられる培地Aは：10mM 硫酸アンモニウム；50mM MOPS/KOH緩衝液、pH7.5；5mM リン酸カリウム緩衝液、pH7.5；2mM $MgCl_2$ ；0.7mM $CaCl_2$ ；50 μ M $MnCl_2$ ；1 μ M $FeCl_3$ ；1 μ M $ZnCl$ ；1.72 μ M $CuSO_4$ ；2.53 μ M $CoCl_2$ ；2.42 μ M Na_2MoO_4 ；2 μ M チアミン塩酸塩；0.01% 酵母抽出物；0.01% カザアミノ酸；0.8 μ g/mL ビタミンB₁₂；及び50 μ g/mL アンピシリンから成る。必要な場合、培地Aに0.2%のグリセロール又は0.2%のグリセロールと0.2%のD-グルコースを補足した。

細胞：

文献でK. アエロゲネス (K. aerogenes) 又はアエロバクテル・アエロゲネス (Aerobacter aerogenes) としても知られるクレブシエラ・ニューモニアエECL2106 (Ruch et al., J. Bacteriol. 124, 348 (1975)) をE. C. C. Lin (Harvard Medical School, Cambridge, MA) から入手し、実験室培養として保持した。

【0144】

クレブシエラ・ニューモニアエATCC 25955をAmerican Type Culture Collection (Manassas, VA) から購入した。

【0145】

E. コリDH5 α をGibco/BRLから購入し、グリセロール又はジオールデヒドラターゼ酵素をコードする遺伝子を含む、クレブシエラ・ニューモニアエATCC 25955から単離されたコスミドDNAを用いて形質転換した。グリセロールデヒドラターゼを含むコスミドをpKP1及びpKP2と同定し、ジオールデヒドラターゼを含むコスミドをpKP4と同定した。形質転換されたDH5 α 細胞をDH5 α -pKP1、DH5 α -pKP2及びDH5 α -pKP4と同定した。

【0146】

E. コリECL707 (Sprenger et al., J. Gen. Microbiol. 135, 1255 (1989)) をE. C. C. Lin (Harvard Medical School, Cambridge, MA) から入手し、同様にクレブシエラ・ニューモニアエからのコスミドDNAを用いて形質転換した。これらの形質転換細胞を、グリセロールデヒドラターゼ遺伝子を含むECL707-pKP1及びECL707-pKP2ならびにジオールデヒドラターゼ遺伝子を含むECL707-pKP4と同定した。

【0147】

tpi遺伝子における突然変異を含むE. コリAA200 (Anderson et al., J. Gen. Microbiol. 62, 329 (1970)) をE. coli Genetic Stock Center, Yale University (New Haven, CT) から購入し、クレブシエラコスミドDNAを用いて形質転換し、グリセロールデヒドラターゼ遺伝子を含む組換え微生物AA200-pKP1及びAA200-pKP2ならびにジオールデヒドラターゼ遺伝子を含むAA200-pKP4を得た。

DH5 α :

K. ニューモニアエDNAを用いてトランスフェクションされたE. コリXL 1-Blue MRの約1, 000のコロニーを含有する6つの形質転換平板を5 mLのLB培地を用いて洗浄し、遠心した。バクテリアをペレット化し、5 mL LB培地+グリセロール中に再懸濁させた。アリコート (50 μ L) を、0.2% グリセロール+mLあたりに400 ngのビタミンB₁₂ + 0.001% 酵母抽出物+50 ampを含むS12合成培地を含有する15 mLの管中に接種した。最上まで管を培地で満たし、パラフィルムでくるみ、30°Cでインキュベーションした。48 h後にわずかな濁りが観測された。78 h及び132 hにおいて上記の通りに産物分布に関して分析されたアリコートは1, 3-プロパンジオールに関して陽性であり、後者の時点には増加した量の1, 3-プロパンジオールを含有した。

【0148】

1, 3-プロパンジオール生産に関して陽性の試験結果を与えたバクテリアを系列的に希釈し、シングルコロニーを単離するためにLB-50 amp平板上に平板培養した。48のシングルコロニーを単離し、再度1, 3-プロパンジオールの生産に関して調べた。6つの独立したクローンからコスミドDNAを単離し、E. コリ株DH5 α 中に形質転換した。形質転換細胞を再度1, 3-プロパンジオールの生産に関して調べた。2つの形質転換細胞をさらに特性化し、DH5 α -pKP1及びDH5 α -pKP2と称した。

【0149】

pIBI31 (IBI Biosystem, New Haven, CT) 中にサブクローニングされたpKP1からの12.1 kb EcoRI-SalIフラグメントを配列決定し、pHK28-26と命名した (配列番号: 1)。配列決定は、グリセロールデヒドラターゼをコードするdhaオペロン及び調節に必要な遺伝子の関連する読取り枠の遺伝子座を明らかにした。配列番号: 1に言及すると、ジヒドロキシアセトンキナーゼをコードするdhaK1に関する読取り枠のフラグメントが塩基1-399に見いだされ (相補配列 (complement)) ; グリセロールデヒドロゲナーゼをコードする読取り枠dhaDが塩基1010-2107に見いだされ ; リプレッサーをコードする読取り枠dha

Rが塩基2209-4134に見いだされ；未知の機能のタンパク質をコードする読取り枠o r f Wが塩基4112-4642に見いだされ（相補配列）；デヒドラターゼ再活性化タンパク質をコードする読取り枠o r f Xが塩基4643-4996に見いだされ（相補配列）；1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする読取り枠d h a Tが塩基5017-6180に見いだされ（相補配列）；未知の機能のタンパク質をコードする読取り枠o r f Yが塩基6202-6630に見いだされ（相補配列）；アルファサブユニットグリセロールデヒドラターゼをコードする読取り枠d h a B 1が塩基7044-8711に見いだされ；ベータサブユニットグリセロールデヒドラターゼをコードする読取り枠d h a B 2が塩基8724-9308に見いだされ；ガンマサブユニットグリセロールデヒドラターゼをコードする読取り枠d h a B 3が塩基9311-9736に見いだされ；デヒドラターゼ再活性化タンパク質をコードする読取り枠d h a B Xが塩基9749-11572に見いだされ；グリセロール吸収促進タンパク質をコードするg l p Fに関する読取り枠のフラグメントが塩基11626-12145に見いだされる。

【0150】

K. ニューモニアエからの詰込まれたコスミドDNAを用いてトランスフェクションされたE. コリXL1-Blue MRのシングルコロニーを200 μ LのS15培地（硫酸アンモニウム、10 mM；リン酸カリウム緩衝液、pH7.0、1 mM；MOPS/KOH緩衝液、pH7.0、50 mM；MgCl₂、2 mM；CaCl₂、0.7 mM；MnCl₂、50 μ M；FeCl₃、1 μ M；ZnCl₂、1 μ M；CuSO₄、1.72 μ M；CoCl₂、2.53 μ M；Na₂MoO₄、2.42 μ M；及びチアミン塩酸塩、2 μ M）+0.2%のグリセロール+400 ng/mLのビタミンB₁₂ +0.001%の酵母抽出物+50 μ g/mLのアンプシリンを含有するマイクロタイターウェル中に接種した。マイクロタイターウェルの他に、LB-50 ampを含有するマスター平板にも接種した。96 h後、100 μ Lを採取し、0.2ミクロンナイロン膜フィルターを含有するRainin遠心管中で遠心した。バクテリアを保留し、濾液をHPLC分析のために処理した。約240のコロニーをスクリーニングした後に1, 3-プロ

パンジオール生産を示す陽性のクローンを同定した。3つの陽性のクローンを同定し、その中の2つをLB-50amp上で成長させ、その中の1つは成長できなかった。LB-50amp上で成長した2つの陽性のクローンの1つから単離され、1, 3-プロパンジオールの生産に関して立証されたシングルコロニーをpKP4と称した。pKP4を含有するE. コリ株からコスミドDNAを単離し、E. コリ株DH5 α を形質転換した。DH5 α -pKP4と称される独立した形質転換細胞を1, 3-プロパンジオールの生産に関して立証した。

ECL707:

E. コリ株ECL707をpKP1、pKP2、pKP4の1つに対応するコスミドK. ニューモニアエDNA又はSupercoosベクターのみを用いて形質転換し、それぞれECL707-pKP1、ECL707-pKP2、ECL707-pKP4及びECL707-scと命名した。ECL707は、それぞれATP-依存性グリセロールキナーゼ、NAD⁺-結合グリセロールデヒドロゲナーゼ及びホスホエノールピルビン酸-依存性ホスホトランスフェラーゼシステムのジヒドロキシアセトンのための酵素IIをコードするglpK、glpD及びptsDが欠失している。

【0151】

LB-50amp平板から単離された、それぞれのコスミド形質転換の20のシングルコロニー及びSupercoosベクターのみ（負の対照標準）の形質転換の5つのシングルコロニーをマスターLB-50amp平板に移した。これらの単離物を、それらがデヒドラターゼ活性を含有しているかどうかを決定するために、グリセロールを1, 3-プロパンジオールに転換するそれらの能力に関しても調べた。無菌のつまようじを用い、0.2%のグリセロール又は0.2%のグリセロールと0.2%のD-グルコースが補足された200 μ Lの培地Aを含有するマイクロタイター平板に形質転換細胞を移した。30℃における48hの間のインキュベーションの後、マイクロタイター平板ウェルの内容物を0.45ミクロンナイロンフィルターを介して濾過し、HPLCによりクロマトグラフィーにかけた。これらの試験の結果を表2に示す。

【0152】

【表3】

表2

形質転換されたECL707によるグリセロールの1,3-プロパンジオールへの転換

形質転換	グリセロール*	グリセロールとグルコース*
ECL707-pKP1	19/20	19/20
ECL707-pKP2	18/20	20/20
ECL707-pKP4	0/20	20/20
ECL707-sc	0/5	0/5

*(陽性単離物の数/調べた単離物の数)

【0153】

AA200 :

E. コリ株AA200をpKP1、pKP2、pKP4の1つに対応するコスミドK. ニューモニアエDNA及びSupercoSベクターのみを用いて形質転換し、それぞれAA200-pKP1、AA200-pKP2、AA200-pKP4及びAA200-scと命名した。株AA200はトリオースリン酸イソメラーゼが欠失している (tpi)。

【0154】

E. コリ株ECL707に関して記載した通り、それぞれのコスミド形質転換の20のシングルコロニー及びエンプティベクター形質転換の5つのシングルコロニーを単離し、グリセロールを1, 3-プロパンジオールに転換するそれらの能力に関して調べた。これらの試験の結果を表3に示す。

【0155】

【表4】

表3

形質転換されたAA200によるグリセロールの1,3-プロパンジオールへの転換

<u>形質転換</u>	<u>グリセロール*</u>	<u>グリセロールとグルコース*</u>
AA200-pKP1	17/20	17/20
AA200-pKP2	17/20	17/20
AA200-pKP4	2/20	16/20
AA200-sc	0/5	0/5

* (陽性単離物の数/調べた単離物の数)

【0156】

実施例2

グルコースからのグリセロールの生産のための

E. コリFM5のグリセロールキナーゼ突然変異体の操作 (engineering)

E. コリFM5におけるグリセロールキナーゼ遺伝子置換のための組込みプラスミドの構築:

Puregene DNA Isolation Kit (Gentra Systems, Minneapolis, MN) を用いてE. コリFM5 (ATCC 53911) ゲノムDNAを調製した。部分的g1pF及びグリセロールキナーゼ (g1pK) 遺伝子を含有する1.0kbのDNAフラグメントをFM5ゲノムDNAから、プライマー配列番号: 2及び配列番号: 3を用い、PCR (Mullis and Faloona, Methods Enzymol. 155, 335 (1987)) により増幅した。部分的g1pK及びg1pX遺伝子を含有する1.1kbのDNAフラグメントをFM5ゲノムDNAから、プライマー配列番号: 4及び配列番号: 5を用い、PCRにより増幅した。プライマー配列番号: 4中にMunI部位を導入した。プライマー配列番号: 4の5'末端はプライマー配列番号: 3の逆相補配列であり、続くオーバーラップエクステンションPCR (overlap extension PCR) を可能にした。オーバーラップエクステンション法 (Horton et al., Bio Techniques 8, 528 (1990)) による遺伝子スプライシン

グを用い、鋳型としての上記の2つのPCRフラグメント及びプライマー配列番号：2及び配列番号：5を用いるPCRによって2.1 kbのフラグメントを形成した。このフラグメントは1.5 kbのg l p K遺伝子の中心領域からの0.8 kbの欠失を示した。全体として、このフラグメントはMun I クローニング部位（部分的g l p K内）の両側上に1.0 kb及び1.1 kbのフランキング領域を有し、相同的組換えによる染色体遺伝子置換を可能にした。

【0157】

上記の2.1 kbのPCRフラグメントを平滑末端化し（ムングビーンヌクレアーゼ（mung bean nuclease）を用いて）、Zero Blunt PCR Cloning Kit（Invitrogen, San Diego, CA）を用いてpCR-Bluntベクター中にクロヘニングし、カナマイシン及びゼオシン耐性遺伝子を含有する5.6 kbのプラスミドpRN100を得た。バクテリオファージ P1 loxP部位（Snaith et al., Gene 166, 173（1995））によりフランキングされたクロラムフェニコール耐性遺伝子を含有するpLoxCat1からの1.2 kbのHinc IIフラグメント（未公開の結果）を用い、プラスミドpRN100中のg l p Kフラグメントを、それをMun I ー消化された（且つ平滑末端化された）プラスミドpRN100に連結することにより分断し、6.9 kbのプラスミドpRN101-1を得た。R6K起点を含有する376 bpのフラグメントを、プライマー配列番号：6及び配列番号：7を用いてベクターpGP704（Miller and Mekalanos, J. Bacteriol. 170, 2575-2583（1988））からPCRにより増幅し、平滑末端化し、pRN101-1からの5.3 kbのAsp 718-Aat IIフラグメント（平滑末端化された）に連結し、カナマイシン及びクロラムフェニコール耐性遺伝子を含有する5.7 kbのプラスミドpRN102-1を得た。pRN102-1の形成のための、R6K起点を用いるpRN101-1中のColE1起点領域の置換は、ほとんどのゼオシン耐性遺伝子の欠失も含んだ。pRN102-1複製のための宿主は、R6K起点の機能のために必要なpir遺伝子を含有するE. コリSY327（Miller and Mekalanos, J. Bac

teriol. 170, 2575-2583 (1988)) であった。

クロラムフェニコール耐性遺伝子分断 (interrupt) を有するグリセロールキナーゼ突然変異体 R J F 1 0 m の操作 :

E. コリ FM5 を非一複製組込みプラスミド p R N 1 0 2 - 1 を用いて電気形質転換し (electrotransformed)、クロラムフェニコール耐性 ($12.5 \mu\text{L}/\text{mL}$) 及びカナマイシン感受性 ($30 \mu\text{g}/\text{mL}$) である形質転換細胞をさらに 1mM のグリセロールを含有する M9 最少培地上で、グリセロール非一使用 (non-utilization) に関してスクリーニングした。1つのそのような突然変異体、R J F 1 0 m からのゲノム DNA の EcoRI 消化は、サザン分析 (Southern, J. Mol. Biol. 98, 503-517 (1975)) を介して無損傷の glpK 遺伝子を用いて精査すると、それが二重一交差組込み体 (double-crossover integrant) (glpK 遺伝子置換) であることを示し、それはクロラムフェニコール耐性遺伝子内における追加の EcoRI 部位の存在のおかげで、2つの予測される 7.9kb 及び 2.0kb バンドが観察されたからである。野生型対照標準は1つの予測された 9.4kb バンドを与えた。突然変異体 R J F 1 0 m の ^{13}C NMR 分析は、それが ^{13}C 一標識されたグリセロールと ATP をグリセロール-3-リン酸に転換できないことを確証した。この glpK 突然変異体をさらに、プライマーの組合わせ、配列番号: 8 と配列番号: 9、配列番号: 10 と配列番号: 11 及び配列番号: 8 と配列番号: 11 を用いるゲノム PCR により分析し、それらはそれぞれ予測される 2.3kb 、 2.4kb 及び 4.0kb の PCR フラグメントを与えた。野生型対照標準は、プライマー配列番号: 8 及び配列番号: 11 を用い、予測される 3.5kb のバンドを与えた。glpK 突然変異体 R J F 1 0 m をプラスミド p A H 4 8 を用いて電気形質転換し、グルコースからのグリセロール生産を可能にした。glpK 突然変異体、E. コリ R J F 1 0 m を 1997 年 11 月 24 日に、Budapest 条約の協約下に、ATCC に寄託した。

クロラムフェニコール耐性遺伝子分断が除去されたグリセロールキナーゼ突然変異体 R J F 1 0 の操作 :

YENB培地（0.75% 酵母抽出物、0.8% 栄養ブイヨン）上で37℃において終夜成長させた後、IPTG-誘導lacUV5プロモーターの調節下のバクテリオファージP1 Creリコンビナーゼ遺伝子、温度-感受性pSC101レプリコン及びアンピシリン耐性遺伝子を含有するプラスミドpJW168（未公開の結果）を用い、水懸濁液中のE. コリRJF10mを電気形質転換した。SOC培地中で30℃において発芽後成長させ、カルベニシリン（50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）及びIPTG（1mM）が補足されたLB寒天培地上で30℃（pJW168複製のために許される温度）において、形質転換細胞を選択した。Creリコンビナーゼにより媒介されるloxP部位における組換えを介する染色体クロラムフェニコール耐性遺伝子の切除を可能にするために、カルベニシリン及びIPTGが補足された新しいLB寒天培地上で30℃において、プールされたコロニーの2回連続終夜転移を行った（Hoess and Abremski, J. Mol. Biol. 181, 351-362 (1985)）。得られるコロニーをカルベニシリン及びIPTGが補足されたLB寒天培地ならびにクロラムフェニコール（12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）が補足されたLB寒天上にレプリカ平板培養し、カルベニシリン-耐性且つクロラムフェニコール-感受性で、マーカー遺伝子の除去を示すコロニーを同定した。1つのそのようなコロニーの終夜30℃培養物を用い、10mLのLB培地に接種した。30℃で0.6AUのOD（600nm）まで成長させ、培養物を37℃で終夜インキュベーションした。いくつかの希釈物をあらかじめ温められたLB寒天培地上で平板培養し、平板を42℃（pJW168複製のために許されない温度）で終夜インキュベーションした。得られるコロニーをLB寒天培地及びカルベニシリン（75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）が補足されたLB寒天培地上にレプリカ平板培養し、カルベニシリン-感受性であり、プラスミドpJW168の喪失を示すコロニーを同定した。1つのそのようなg1pK突然変異体、RJF10をプライマー配列番号：8及び配列番号：11を用いるゲノムPCRによりさらに分析し、予測される3.0kbバンドを得、マーカー遺伝子の切除を確認した。1mMグリセロールを含有するM9最少培地上で成長しないことにより、突然変異体RJF10によるグリセロール非-使用が確認された。g1pK突然変異体RJF10をプラスミドpAH48を用

いて電気形質転換し、グルコースからのグリセロール生産を可能にした。

【0158】

実施例3

g l d A遺伝子ノックアウト (k n o c k o u t) を有するE. コリ株の構築

それぞれ末端S p h 1及びX b a 1部位が導入されたプライマー配列番号：12及び配列番号：13を用いるPCR (K. B. M u l l i s a n d F. A. F a l o o n a, M e t h. E n z y m o l. 155, 335-350 (1987)) によりE. コリからg l d A遺伝子を単離し、p U C 18中のS p h 1及びX b a 1部位の間にクローニングし (T. M a n i a t i s (1982) M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l . C o l d S p r i n g H a r b o r, C o l d S p r i n g H a r b o r, N Y)、p K P 8を形成した。p K P 8をg l d A遺伝子内のユニークS a l 1及びN c o 1部位において切断し、末端をK l e n o wを用いて平滑化し、連結し、g l d Aの中間における109 b pの欠失及びユニークS a l 1部位の再生を生じ、p K P 9を形成した。カナマイシン耐性を与える遺伝子 (k a n) を含有し、翻訳開始コドンの上流に約400 b p sのDNA及び翻訳停止コドンの下流に約100 b p sのDNAを含む1.4 k bのDNAフラグメントを、末端S a l 1部位が導入されたプライマー配列番号：14及び配列番号：15を用いるPCRによりp E T-28 a (+) (N o v a g e n, M a d i s o n, W i s) から単離し、p K P 9のユニークS a l 1部位中にサブクローニングし、p K P 13を形成した。g l d A翻訳開始コドンの204 b p s下流で始まり、g l d A翻訳停止コドンの178 b p s上流で終わり、k a n挿入片を含有する2.1 k bのDNAフラグメントを、それぞれ末端S p h 1及びX b a 1部位が導入されたプライマー配列番号：16及び配列番号：17を用いるPCRによりp K P 13から単離し、p M A K 705 (G e n e n c o r I n t e r n a t i o n a l, P a l o A l t o, C A) 中のS p h 1及びX b a 1部位の間にサブクローニングし、p M P 33を形成した。p M P 33を用いてE. コリF M5を形質転換し、p M A K 705複製のために許される温度である30℃で20 μ g / m Lのk a n上において選択した。20 μ g / m Lのk a nが補足され

た液体培地中で30℃において、1つのコロニーを終夜拡大させた (expanded)。約32,000の細胞を20 µg/mLのkan上で平板培養し、pMAK705複製のための制限温度である44℃において16時間インキュベーションした。44℃で成長する形質転換細胞は染色体中に組込まれたプラスミドを有し、約0.0001の頻度で存在する。PCR及びサザンブロット (E. M. Southern, J. Mol. Biol. 98, 503-517 (1975)) 分析を用い、形質転換細胞における染色体組込み結果 (event) の性質を決定した。ウェスタンブロット分析 (Towbin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 4350 (1979)) を用い、gldAの産物であるグリセロールデヒドロゲナーゼタンパク質が形質転換細胞中で生産されるかどうかを決定した。活性アッセイを用い、グリセロールデヒドロゲナーゼ活性が形質転換細胞中に残っているかどうかを決定した。フェナジンメトサルフェートを媒介物として用い、グリセロールとNAD⁺のジヒドロキシアセトンとNADHへの転換をテトラゾリウム色素、MTT [3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド]の濃く着色するホルマザンへの転換にカップリングさせることにより、未変性ゲル上でのグリセロールデヒドロゲナーゼバンドにおける活性を決定した。グリセロールデヒドロゲナーゼは30 mM 硫酸アンモニウム及び100 mM Tris、pH 9の存在も必要とする (Tang et al., J. Bacteriol. 140, 182 (1997))。分析された8つの形質転換細胞の中で6つがgldAノックアウトであると決定された。E. コリMSP33.6を1997年11月24日に、ブタペスト条約の協約下に、ATCCに寄託した。

【0159】

実施例4

glpK及びgldA遺伝子ノックアウトを有するE. コリ株の構築

gldA遺伝子を含有し、翻訳開始コドンの上流に228 bpsのDNA及び翻訳停止コドンの下流に220 bpsのDNAを含む1.6 kbのDNAフラグメントを、それぞれ末端Sph I及びXba I部位が導入されたプライマー配列番号: 18及び配列番号: 19を用いるPCRによりE. コリから単離し、pU

C18のSph1及びXba1部位の間にクローニングし、pQN2を形成した。pQN2をgldA遺伝子内のユニークSal1及びNco1部位において切断し、末端をKlenowを用いて平滑化し、連結し、gldAの中間における109bpの欠失及びユニークSal1部位の再生を生じ、pQNを形成した。カナマイシン耐性を与える遺伝子(kan)を含有し、loxP部位によりフランキングされた1.2kbのDNAフラグメントをpLoxKan2 (Genencor International, Palo Alto, CA) からStu1/Xho1フラグメントとして単離し、Klenowを用いて末端を平滑化し、pQN4中に、Klenowを用いる平滑化の後にSal1部位においてサブクローニングし、pQN8を形成した。R6K複製起点を含有する0.4kbのDNAフラグメントを、それぞれ末端Sph1及びXba1部位が導入されたプライマー配列番号:20及び配列番号:21を用いるPCRによりpGP704 (Miller and Mekalanos, J. Bacteriol. 170, 2575-2583 (1988)) から単離し、pQN8からのgldA::kanカセットを含有する2.8kbのSph1/Xba1 DNAフラグメントに連結し、pKP22を形成した。クロラムフェニコール耐性を与える遺伝子(cam)を含有し、loxP部位によりフランキングされた1.0kbのDNAフラグメントを、pLoxCat2 (Genencor International, Palo Alto, CA) からXba1フラグメントとして単離し、pKP22中にXba1部位においてサブクローニングし、pKP23を形成した。glpK-であるE. コリ株RJF10 (実施例2を参照されたい) をpKP23を用いて形質転換し、表現型kanRcamSを有する形質転換細胞を単離し、二重交差組込みを示し、それをサザンブロット分析により確認した。グリセロールデヒドロゲナーゼゲル活性アッセイ (実施例3に記載した通り) は、これらの形質転換細胞中に活性なグリセロールデヒドロゲナーゼが存在しないことを示した。実施例2に記載した通りにCre-生産プラスミドpJW168を用いて染色体からkanマーカークを除去し、株KLP23を得た。表現型kanSを有するいくつかの単離物はグリセロールデヒドロゲナーゼ活性を示さず、サザンブロット分析はkanマーカークの喪失を確認した。

【0160】

実施例5

グリセロール3-リン酸デヒドロゲナーゼ (DAR1) 及び／又はグリセロール3-ホスファターゼ (GPP2) の発現のためのプラスミド構築及び株構築
グリセロール3-ホスファターゼ (gpp2) のための発現カセットの構築:

サッカロミセス・セレビスシアエ染色体Vラムダクローン6592 (GenBank, 受け入れ番号U18813x11) をATCCから得た。5'末端にBamHI-RBS-XbaI部位及び3'末端にSmaI部位が導入された合成プライマー (配列番号: 22及び配列番号: 23) を用いる、標的DNAとしてのラムダクローンからのクローニングにより、グリセロール3-リン酸ホスファターゼ遺伝子 (GPP2) をクローニングした。産物をpCR-Script (Stratagene, Madison, WI) 中にSrfI部位においてサブクローニングし、GPP2を含有するプラスミドpAH15を形成した。プラスミドpAH15はpCR-Script SK+中のlacプロモーターからの発現に関して不活性な配向でGPP2遺伝子を含む。GPP2遺伝子を含むpAH15からのBamHI-SmaIフラグメントをpBlueScript II SK+中に挿入し、プラスミドpAH19を形成した。pAH19はlacプロモーターからの発現に関して正しい配向でGPP2遺伝子を含む。GPP2遺伝子を含むpAH19からのXbaI-PstIフラグメントをpPHOX2中に挿入し、プラスミドpAH21を作った。pAH21/DH5αは発現プラスミドである。

グリセロール3-リン酸デヒドロゲナーゼ (DAR1) のための発現カセットの構築:

合成プライマー (配列番号: 24及び配列番号: 25) を用いるゲノムS. セレビスシアエDNAからのPCRクローニングにより、DAR1を単離した。成功したPCRクローニングは、DAR1の5'末端にNcoI部位を置き、NcoI中のATGがDAR1イニシエーターメチオニンである。DAR1の3'末端にBamHI部位が翻訳ターミネーターに続いて導入されている。PCRフラグメントをNcoI+BamHIを用いて消化し、発現プラスミドpTrc99A

(Pharmacia, Piscataway, NJ) 内の同じ部位中にクローニングし、pDAR1Aを得た。

【0161】

DAR1の5'末端により良いリボソーム結合部位を作るために、合成プライマー（配列番号：26と配列番号：27）のアニーリングにより得たSpeI-RBS-NcoIリンカーをpDAR1AのNcoI部位中に挿入し、pAH40を作った。プラスミドpAH40は、pTrc99A（Pharmacia, Piscataway, NJ）のtrcプロモーターからの発現に関して正しい配向で新しいRBS及びDAR1遺伝子を含有する。pDAR1AからのNcoI-BamHIフラグメント及び合成プライマー（配列番号：28と配列番号：29）のアニーリングにより得た第2の組のSpeI-RBS-NcoIリンカーをpBC-SK+（Stratagene, Madison, WI）のSpeI-BamHI部位中に挿入し、プラスミドpAH42を作った。プラスミドpAH42はクロラムフェニコール耐性遺伝子を含有する。

dar1及びgpp2のための発現カセットの構築：

DAR1及びGPP2のための発現カセットを、標準的分子生物学的方法を用い、上記のそれぞれのDAR1及びGPP2サブクローンから組み立てた。リボソーム結合部位（RBS）及びGPP2遺伝子を含有するpAH19からのBamHI-PstIフラグメントをpAH40中に挿入し、pAH43を作った。RBS及びGPP2遺伝子を含有するpAH19からのBamHI-PstIフラグメントをpAH42中に挿入し、pAH45を作った。

【0162】

GPP2の5'末端におけるリボソーム結合部位を以下の通りに修正した。合成プライマーGATCCAGGAAACAGA（配列番号：30）をCTAGTCTGTTTCTCTG（配列番号：31）と、GPP2遺伝子を含有するpAH19からのXbaI-PstIフラグメントにアニーリングすることにより得たBamHI-RBS-SpeIリンカーをpAH40のBamHI-PstI部位中に挿入し、pAH48を作った。プラスミドpAH48は、pTrc99A（Pharmacia, Piscataway, NJ）のtrcプロモーターか

らの発現に関して正しい配向でDAR1遺伝子、修正RBS及びGPP2遺伝子を含む。

E. コリの形質転換：

本明細書に記載するプラスミドを、標準的な分子生物学的方法を用いてE. コリDH5 α 、FM5及びKLP23中に形質転換した。形質転換細胞をそれらのDNA RFLPパターンにより実証した。

【0163】

実施例6

クレブシエラ・ニューモニアエdhaレギュロンからの遺伝子を有する
エシェリキア・コリの形質転換において用いるための発現プラスミドの構築
発現ベクターpTacIQの構築：

lacIq遺伝子 (Farabaugh, Nature 274 (5673), 765-769 (1978)) 及びtacプロモーター (Amann et al., Gene 25, 167-178 (1983)) をpBR322 (Sutcliffe, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 43, 77-90 (1979)) の制限エンドヌクレアーゼ部位EcoRI中に挿入することにより、E. コリ発現ベクターpTacIQを調製した。多重クローニング部位 (a multiple cloning site) 及びターミネーター配列 (配列番号：32) がEcoRIからSphIまでpBR322配列に取って代わる (replaces)。

グリセロールデヒドラターゼ遺伝子 (dhaB1、2、3、X) のサブクローニング：

5'末端にEcoRI部位及び3'末端にXbaI部位が導入されたプライマー (配列番号：33及び配列番号：34) を用いるPCRにより、dhaB3遺伝子のための読取り枠をpHK28-26から増幅した。産物をpLitmus 29 (New England Biolab, Inc., Beverly, MA) 中にサブクローニングし、dhaB3を含むプラスミドpDHAB3を形成した。

【0164】

pHK28-26からのdhaBオペロンのdhaB1、dhaB2、dhaB3及びdhaBXに関する全コード領域を含有する領域を、制限酵素KpnI及びEcoRIを用いてpBluescript I I KS+ (Stratagene, La Jolla, CA) 中にクローニングし、プラスミドpM7を作った。

【0165】

ApaI及びXbaIを用いるプラスミドpM7の消化によりdhaBX遺伝子を除去し、5.9kbフラグメントを精製し、それをプラスミドpDHAB3からの325-bpのApaI-XbaIフラグメントと連結し、dhaB1、dhaB2及びdhaB3を含有するpM11を作った。

【0166】

5'末端にHindIII部位及び共通リボソーム結合部位及び3'末端にXbaI部位が導入されたプライマー（配列番号：35及び配列番号：36）を用いるPCRにより、dhaB1遺伝子のための読取り枠をpHK28-26から増幅した。産物をpLitmus28 (New England Biolab, Inc., Beverly, MA) 中にサブクローニングし、dhaB1を含有するプラスミドpDT1を形成した。

【0167】

dhaB1遺伝子、dhaB2遺伝子及びdhaB3遺伝子の一部を含有するpM11からのNotI-XbaIフラグメントをpDT1中に挿入し、dhaB発現プラスミド、pDT2を作った。pDT2からのdhaB(1、2、3)遺伝子を含有するHindIII-XbaIフラグメントをpTacIQ中に挿入し、pDT3を作った。

1, 3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼ遺伝子(dhaT)のサブクローニング:

1, 3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼ(dhaT)遺伝子を含有するpHK28-26のKpnI-SacIフラグメントをpBluescript I I KS+中にサブクローニングし、プラスミドpAH1を作った。鋳型DNAとしてのpAH1ならびに5'末端にXbaI部位及び3'末端にBamHI部

位が導入された合成プライマー（配列番号：37と配列番号：38）からのPCRにより、dhaT遺伝子を増幅した。産物をpCR-Script（Stratagene）中にSrfI部位においてサブクローニングし、dhaTを含有するプラスミドpAH4及びpAH5を形成した。プラスミドpAH4はpCR-Script中のlacプロモーターからの発現に関して正しい配向でdhaT遺伝子を含み、pAH5は反対の配向でdhaT遺伝子を含み、dhaT遺伝子を含み、pAH4からのXbaI-BamHIフラグメントをpTaccIQ中に挿入し、プラスミドpAH8を形成した。RBS及びdhaT遺伝子を含み、pAH8からのHindIII-BamHIフラグメントをpBluescript I IKS+中に挿入し、pAH11を作った。

dhaT及びdhaB（1、2、3）のための発現カセットの構築：

標準的な分子生物学的方法を用い、dhaT及びdhaB（1、2、3）のための発現カセットを前記のそれぞれのdhaB（1、2、3）及びdhaTサブクローンから組み立てた。pDT3からのdhaB（1、2、3）遺伝子を含み、SpeI-SacIフラグメントをpAH11中にSpeI-SacI部位において挿入し、pAH24を作った。制限酵素SalI-XbaIで消化されたpAH5中にSalI-XbaIリンカー（配列番号：39及び配列番号：40）を挿入し、pDT16を作った。リンカーはXbaI部位を破壊する。次いでpDT16からの1kbのSalI-MluIフラグメントをpAH24中に挿入し、現存するSalI-MluIフラグメントに取って代わらせ、pDT18を作った。pDT18からのSalI-NotIフラグメント及びpM7からのNotI-XbaIフラグメントをpCL1920（配列番号：41）中に挿入することにより、pDT21を構築した。ストレプトミセスからのグルコースイソメラーゼプロモーター配列（配列番号：42）をPCRによりクローニングし、pLitmus28のEcoRI-HindIII部位中に挿入し、pDT5を構築した。pDT5のEcoRI-PvuIIフラグメントをpCL1920のEcoRI-PvuII部位中に挿入することにより、pCL1925を構築した。pDT21のHindIII-MluIIフラグメント及びpDT21のMluI-XbaIフラグメントをpCL1925のHindIII-XbaI

部位中にクローニングすることにより、pDT24を構築した。

dhaT及びdhaB (1、2、3、X) のための発現カセットの構築：

pDT18からのSalI-NoIフラグメント及びpM7からのNoI-XbaIフラグメントをpCL1920 (配列番号：41) 中に挿入することにより、pDT21を構築した。ストレプトミセスからのグルコースイソメラーゼプロモーター配列 (配列番号：42) をPCRによりクローニングし、pLitmus28のEcoRI-HindIII部位中に挿入し、pDT5を構築した。pDT5のEcoRI-PvuIIフラグメントをpCL1920のEcoRI-PvuII部位中に挿入することにより、pCL1925を構築した。pDT21のHindIII-MluIフラグメント及びpDT21のMluI-XbaIフラグメントをpCL1925のHindIII-XbaI部位中にクローニングすることにより、pDT24を構築した。

dhaR、orfY、dhaT、orfX、orfW及びdhaB (1、2、3、X) のための発現カセットの構築：

pHK28-26のSacI-EcoRIフラグメントをpCL1925のSacI-EcoRI部位中に挿入することにより、pDT29を構築した。

dhaR、orfY、orfX、orfW及びdhaB (1、2、3、X) のための発現カセットの構築：

PCR-媒介オーバーラップエクステンションとして既知の方法により、遺伝子dhaTの最初の5つ及び最後の5つのコドン (及び停止コドン) を除くすべてが欠失しているプラスミドpDT29の誘導体を構築した。pDT29を鋳型として用い、以下のプライマーを用いて2つの一次PCR産物を形成した：

配列番号：43=5' GAC GCA ACA GTA TTC CGT CGC 3' ;

配列番号：44=5' ATG AGC TAT CGT ATG TTC CGC CAG GCA TTC TGA GTG TTA ACG 3' ;

配列番号：45=5' GCC TGG CGG AAC ATA CGA TAG CTC ATA ATA TAC 3' ;

配列番号：46=5' CGG GGC GCT GGG CCA GTA CT

G 3'。

【0168】

配列番号：45を配列番号：46と対にし、931bps且つ5' d h a B 1 (ユニーク S c a I 部位まで)、o r f Yのすべて及びd h a Tの最初の5つのコドンを含む核酸を包含する産物を形成した。配列番号：43を配列番号：44と対にし、1348bps且つd h a Tの最後の5つのコドン（及び停止コドン）、o r f Xのすべて、o r f Wのすべて及び5' d h a R（ユニーク S a p I 部位まで）を含む核酸を包含する産物を形成した。配列番号：44の5' 末端における15の塩基は配列番号：45の15塩基部分の逆相補配列である尾部を構成する。同様に、配列番号：45の5' 末端における11の塩基は、配列番号：44の11塩基部分の逆相補配列である尾部を構成する。かくして2つの一次PCR産物をアニーリング（26bp尾部オーバーラップを介する）及びPCRによる伸長（e x t e n d i n g）の後に一緒にし、2253bpsの第3の核酸産物を形成した。この第3のPCR産物をS a p I 及びS c a I を用いて消化し、やはりS a p I 及びS c a I を用いて消化されたp D T 29中に連結し、プラスミドp K P 32を形成し、それはd h a T内における大きな読取り枠内欠失（i n - f r a m e d e l e t i o n）を除いてp D T 29と同じである。

【0169】

実施例7

E. コリ株K L P 23 / p A H 48 / p D T 29を用いるグルコースの

1, 3-プロパンジオールへの転換及び

K L P 23 / p A H 48 / p K P 32を用いる改良法

予備-培養：

K L P 23 / p A H 48 / p D T 29 及び K L P 23 / p A H 48 / p K P 32 を発酵槽への播種のために、200mg / L のカルベニシリン（もしくはアンピシリン）及び50mg / L のスペクチノマイシンを含有する2YT培地（10g / L 酵母抽出物、16g / L トリプトン及び10g / L N a C l）中で予備-培養した。K L P 23 / p A H 48 / p K P 32 は、d h a T が欠失していることを除いてK L P 23 / p A H 48 / p D T 29 と同じである。

【0170】

2-LのErlenmeyerフラスコにおいて500mLの培地中で、凍結材料(frozen stocks) (凍結保護剤として10%DMSO) から培養を開始し、250rpmにおける震盪機中で35℃において、約1.0AUのOD₅₅₀ に達するまで成長させ、発酵槽への播種に用いた。

発酵培地：

以下の成分を発酵槽中で一緒に滅菌した：45g KH₂PO₄、12g クエン酸、12g MgSO₄・7H₂O、30g 酵母抽出物、2.0g クエン酸第2鉄アンモニウム、消泡剤としての5mL Mazu DF204、1.2g CaCl₂・2H₂O及び7.3mL 硫酸。20～28%のNH₄OHを用いてpHを6.8に上げ、以下の成分を加えた：1.2g カルベニシリンもしくはアンピシリン、0.30g スペクチノマイシン、60mLの微量栄養素の溶液及びグルコース(60～67重量%供給材料から)。接種の後、容積は6.0Lであり、グルコース濃度は10g/Lであった。微量栄養素の溶液は(g/L)：クエン酸・H₂O(4.0)、MnSO₄・H₂O(3.0)、NaCl(1.0)、FeSO₄・7H₂O(0.10)、CoCl₂・6H₂O(0.10)、ZnSO₄・7H₂O(0.10)、CuSO₄・5H₂O(0.010)、H₃BO₃(0.010)及びNa₂MoO₄・2H₂O(0.010)を含有した。

発酵成長：

上記の培地を用いて15Lの攪拌されたタンク発酵槽を調製した。温度を35℃で制御し、アンモニア水(20～28重量%)を用いてpHを6.8に調節した。空気流量(1分あたりに6～12標準リットルの最小値に設定)及び攪拌機速度(350～690rpmの最小値に設定)に関する初期値は、OUR値が約140ミリモル/L/hに達したら溶解酸素(DO)制御が開始されるように設定された。背圧は0.5バールで制御された。DO制御は10%に設定された。小さな逸脱を除き、グルコースは60%もしくは67%(重量)供給材料を用いて0g/L～10g/Lにおいて保持された。下記に記す通りにビタミンB₁₂又は補酵素B₁₂を加えた。

KLP23/pAH48/pDT29を用いる発酵：

E. コリ株KLP23/pAH48/pDT29を用いるグルコースの1, 3-プロパンジオール (1, 3-PD) への転換の代表的な発酵の概略を表4に示す。ビタミンB₁₂ (0.075 g/L、500 mL) を、接種から3時間後に開始して16 mL/hの速度で供給した。1, 3-プロパンジオールの収率は24重量% (消費されたグルコースのg当たりの1, 3-プロパンジオールのg) であり、68 g/Lの1, 3-プロパンジオールの力価が得られた。

【0171】

【表5】

表4

E.コリ株KLP23/pAH48/pDT29を用いるグルコースの1,3-プロパンジオール(1,3-PD)への転換の代表的な発酵の概略

時間(h)	OD550 (AU)	DO (%)	グルコース(g/L)	グリセロール(g/L)	1,3-PD (g/L)
0	0	150	12.9	0.0	0
6	17	80	8.3	3.1	1
12	42	53	2.8	12.5	9
18	98	9	5.7	12.6	32
24	136	11	32.8	12.0	51
30	148	10	12.3	13.3	62
32	152	11	12.5	14.3	65
38	159	11	1.5	17.2	68

【0172】

同じビタミンB₁₂ 供給材料を用い、発酵の時間経過を横切る (a c r o s s) ビタミンB₁₂ の2倍濃度の添加又はボーラス添加において類似の結果が得られた。得られた最高の力価は77 g/Lであった。

KLP23/pAH48/pKP32を用いる改良された発酵:

E. コリ株KLP23/pAH48/pKP32を用いるグルコースの1, 3-プロパンジオール (1, 3-PD) への転換の代表的な発酵の概略を表5に示す。ビタミンB₁₂ (0.150 g/L、500 mL) を、接種から3時間後に開始して16 mL/hの速度で供給した。36 h後、2 Lの発酵ブイオンをパージし、グルコース供給材料の連続的添加を可能にした。1, 3-プロパンジオールの収率は26重量% (消費されたグルコースのg当たりの1, 3-プロパンジオ

ールのg)であり、112g/Lの1,3-プロパンジオールの力価が得られた。
。

【0173】

【表6】

表5

E.コリ株KLP23/pAH48/pKP32を用いるグルコースの1,3-プロパンジオール(1,3-PD)への改良された転換の代表的な発酵の概略

時間(h)	OD550 (AU)	DO (%)	グルコース(g/L)	グリセロール(g/L)	1,3-PD (g/L)
0	0	148	12.8	0.0	0
6	22	84	6.9	3.3	0
12	34	90	9.7	10.4	7
18	66	43	9.3	5.9	24
24	161	9	0.2	2.5	46
30	200	10	0.2	6.0	67
36	212	10	1.2	9.7	88
42	202	2	0.1	15.5	98
48	197	12	1.2	23.8	112

【0174】

同じビタミンB₁₂ 供給材料を用い、発酵の時間経過を横切るビタミンB₁₂ の半分の濃度の添加又はボーラス添加において類似の結果が得られた。得られた最高の力価は114g/Lであった。

【0175】

実施例8

グルコースからの1,3-プロパンジオールの高められた収率のための

E. コリKLP23のトリオースリン酸イソメラーゼ突然変異体の操作

E. コリKLP23におけるトリオースリン酸イソメラーゼ遺伝子置換のためのプラスミドの構築：

Puregene DNA Isolation Kit (Gentra Systems, Minneapolis, MN) を用いてE. コリKLP23ゲノムDNAを調製した。cdh及びトリオースリン酸イソメラーゼ(tpiA) 遺伝子の3'末端を含有する1.0kbのDNAフラグメントを、プライマー配

列番号：47及び配列番号：48を用いてKLP23ゲノムDNAからPCR（Mullis and Faloona, Methods Enzymol. 155, 335-350 (1987)）により増幅した。tpiAの5'末端、yiiQ及びyiiR遺伝子の5'末端を含有する1.0kbのDNAフラグメントを、プライマー配列番号：49及び配列番号：50を用い、KLP23ゲノムDNAからPCRにより増幅した。プライマー配列番号：49中にはScaI部位が導入された。プライマー配列番号：49の5'末端はプライマー配列番号：48の逆相補配列であり、続くオーバーラップエクステンションPCRを可能にした。オーバーラップエクステンション法（Horton et al., Bio Techniques 8, 528-535 (1990)）による遺伝子切除を用い、鋳型として上記の2つのPCRフラグメント及びプライマー配列番号：47及び配列番号：50を用いるPCRにより2.0kbのフラグメントを形成した。このフラグメントは、768bpのtpiA構造遺伝子の73%の欠失を示した。全体としてこのフラグメントは（部分的tpiA内の）ScaIクローニング部位の両側上に1.0kbのフランキング領域を有し、相同的組換えによる染色体遺伝子置換を可能にした。

【0176】

上記の平滑末端化された2.0kbのPCRフラグメントを、Zero Blunt PCR Cloning Kit (Invitrogen, San Diego, CA)を用いてpCR-Bluntベクター中にクローニングし、カナマイシン及びゼオシン耐性遺伝子を含有する5.5kbのプラスミドpRN106-2を得た。バクテリオファージP1 loxP部位（Snaitth et al., Gene 166, 173-174 (1995)）によりフランキングされたクロラムフェニコール耐性遺伝子を含有するpLoxCat1（未公開の結果）からの1.2kbのHincIIフラグメントを用い、プラスミドpRN106-2中のtpiAフラグメントを、それをScaI消化プラスミドpRN106-2に連結することにより分断し、6.8kbのプラスミドpRN107-1を得た。

線状DNA形質転換によるトリオースリン酸イソメラーゼ突然変異体RJ8mの

操作：

鋳型として pRN107-1 ならびにプライマー配列番号：47 及び配列番号：50 を用い、tpiA フランキング領域及び loxP-CmR-loxP カセットを含有する 3.2 kb フラグメントを PCR 増幅し、ゲル抽出した。最高で 1 µg のこの 3.2 kb の線状 DNA フラグメントを用いて E. コリ KLP23 を電気形質転換し、クロラムフェニコール耐性 (12.5 µg/mL) 且つカナマイシン感受性 (30 µg/mL) である形質転換細胞を M9 最少培地上で、1 mM グルコース上における劣ったグルコース使用に関して、1 mM グルコネート上における正常なグルコネート使用に関して、および 1 mM グルセロール上における宿主 KLP23 のグリセロール非使用表現型を確かめるためにさらにスクリーニングした。1 つのそのような突然変異体、RJ8m からのゲノム DNA の EcoRI 消化は、無損傷の tpiA 遺伝子を用い、サザン分析 (Southern, J. Mol. Biol. 98, 503-517 (1975)) を介して精査すると、それが二重交差組込み体 (tpiA 遺伝子置換) であることを示し、それはクロラムフェニコール耐性遺伝子内における追加の EcoRI 部位の存在のおかげで 2 つの予測される 6.6 kb 及び 3.0 kb バンドが観察されるからであった。予測通り、宿主 KLP23 及び野生型 FM5 対照標準は、それぞれ単独の 8.9 kb 及び 9.4 kb バンドを与えた。この tpiA 突然変異体をプライマー配列番号：51 及び配列番号：52 を用いるゲノム PCR によりさらに分析し、それは予測される 4.6 kb の PCR フラグメントを与えたが、同じプライマー対に関し、宿主 KLP23 及び野生型 FM5 株は両方とも予測される 3.9 kb の PCR フラグメントを与えた。tpiA 突然変異体 RJ8m 及び宿主 KLP23 からの無細胞抽出物を、基質としてグリセルアルデヒド 3-リン酸を用いて tpiA 活性に関して調べると、RJ8m の場合には活性が観察されなかった。プラスミド pAH48 を用いて tpiA 突然変異体 RJ8m を電気形質転換し、グルコースからのグリセロール生産を可能にし、又、プラスミド pAH48 と pDT29 もしくは pKP32 の両方を用いて電気形質転換し、グルコースからの 1,3-プロパンジオール生産を可能にした。RJ8m からクロラムフェニコール耐性マーカーを除去して RJ8 を得た。

【0177】

実施例9

E. コリ株R J 8 / p A H 4 8 / p D T 2 9を用いる
グルコースの1, 3-プロパンジオールへの転換及び
R J 8 / p A H 4 8 / p K P 3 2を用いる改良法

予備一培養：

実施例7に記載した通り、R J 8 / p A H 4 8 / p D T 2 9及びR J 8 / p A H 4 8 / p K P 3 2を発酵槽への播種のために予備一培養した。R J 8 / p A H 4 8 / p K P 3 2は、d h a Tが欠失していることを除いてR J 8 / p A H 4 8 / p D T 2 9と同じである。

発酵槽培地：

発酵槽培地は実施例7に記載した通りであった。

発酵成長：

発酵槽成長は、空気流量（分あたりに5～6標準リットルの最小値に設定）及び攪拌機速度（300～690rpmの最小値に設定）に関する初期値を、OUR値が60～100ミリモル/L/hに達したら溶解酸素（DO）制御が開始されるように設定したことを除いて、実施例7に記載した通りであった。下記に記す通りにビタミンB₁₂又は補酵素B₁₂を加えた。

R J 8 / p A H 4 8 / p D T 2 9を用いる発酵：

E. コリ株R J 8 / p A H 4 8 / p D T 2 9を用いるグルコースの1, 3-プロパンジオール（1, 3-PD）への転換の代表的な発酵の概略を表6に示す。ビタミンB₁₂は、2、8及び26hにそれぞれ2、16及び16mgのボーラス添加として与えた。1, 3-プロパンジオールの収率は35重量%（消費されたグルコースのg当たりの1, 3-プロパンジオールのg）であり、50.1g/Lの1, 3-プロパンジオールの力価が得られた。

【0178】

【表7】

表6

E.コリ株RJ8/pAH48/pDT29を用いるグルコースの1,3-プロパンジオール(1,3-PD)への転換の代表的な発酵の概略

時間(h)	OD550 (AU)	DO (%)	グルコース(g/L)	グリセロール(g/L)	1,3-PD (g/L)
0	0	140	10.6	0.1	0.0
6	5	107	11.1	0.5	0.4
10	16	90	8.5	1.7	1.3
14	25	86	1.8	2.4	5.9
19	38	53	3.5	5.9	15.4
25	53	38	0.1	9.2	26.7
31	54	10	4.5	7.4	39.0
37	37	23	17.2	6.0	45.0
43	21	13	9.9	7.7	50.1

【0179】

RJ8/pAH48/pKP32を用いる改良された発酵：

E. コリ株RJ8/pAH48/pKP32を用いるグルコースの1, 3-プロパンジオール(1, 3-PD)への転換の代表的な発酵の概略を表7に示す。ビタミンB₁₂は、約26及び44時間にそれぞれ48及び16mgのボーラス添加として与えた。1, 3-プロパンジオールの収率は34重量%(消費されたグルコースのg当たりの1, 3-プロパンジオールのg)であり、129g/Lの1, 3-プロパンジオールの力価が得られた。

【0180】

【表8】

表7

E.コリ株RJ8/pAH48/pKP32を用いるグルコースの1,3-プロパンジオール(1,3-PD)への改良された転換の代表的な発酵の概略

時間(h)	OD550 (AU)	DO (%)	グルコース(g/L)	グリセロール(g/L)	1,3-PD (g/L)
0	0	150	12.6	0.1	0
6	12	113	6.0	2.6	0
12	24	99	0.0	10.6	0
18	51	76	2.4	28.9	0
24	78	82	2.4	44.2	5
30	114	70	3.8	26.9	33
36	111	72	0.0	20.0	57
42	139	65	0.1	21.9	69
48	157	36	0.1	22.4	79
55	158	25	0.2	21.4	94
64	169	14	0.1	15.8	113
72	169	12	0.1	13.4	119
74	162	14	0.1	14.8	129

【0181】

実施例10

改良された1, 3-プロパンジオールプロセスにおける

E. コリ非-特異的触媒活性 (y g h D) の同定

改良された触媒を用いる1, 3-プロパンジオール生産発酵における非-特異的触媒活性の立証：

1, 3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼ活性に関する全細胞アッセイを用い、発酵条件下で、ビタミンB₁₂の添加及び3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド(3-HPA)の生産の後に非-特異的触媒活性がE. コリ中に存在するが、前には存在しないことを示した。グリセロール生産及び1, 3-プロパンジオール生産プラスミド、それぞれpAH48及びpKP32を含有する組換えE. コリ株を10Lの発酵槽において、本質的に実施例7に記載した通りに、しかしビタミンB₁₂の不在下で成長させた。タンクが約100のOD₅₅₀に達したらビタミンB₁₂ボラス(48mg)を加えた。ビタミンB₁₂の添加の直前及び2h後に細胞のアリコートをタンクから採取した。遠心により細胞を回収し、新し

いタンパク質合成を妨げるために150 μ g/mLのクロラムフェニコールを含むPBS緩衝液中にそれらの最初の容積まで再懸濁させた。最終的容積が、約10のOD₅₅₀において50 mLとなるのに適した容積のクロラムフェニコール処理細胞を、反応混合物(10 g/L グルコース、10 g/L グリセロール、1 mg/L 補酵素B₁₂ 及び150 μ g/mL クロラムフェニコールを含むPBS緩衝液)を含む250 mLのバフドフラスコ(baffled flask)に加えた。光から保護されたフラスコを35℃で250 rpmにおいて震盪させた。時間の経過に及んでHPLC分析のためのアリコート採取した。ビタミンB₁₂ 添加の前もしくは後に発酵槽から回収された細胞を含むフラスコ中で、3-HPAの時間-依存的生産が観察された。まさに対照的に、ビタミンB₁₂ 添加の後に発酵槽から回収された細胞を含むフラスコのみにおいて、有意なレベルの1, 3-プロパンジオールが観察された。

無細胞抽出物中における非特異的触媒活性の検出:

未変性ゲル活性染色アッセイ(native gel activity stain assay)を用い、無細胞抽出物中における非特異的触媒活性を示した。ビタミンB₁₂ の添加の前及び後に、グリセロール生産及び1, 3-プロパンジオール生産プラスミド、それぞれpAH48及びpKP32を含む組換えE. コリ株を用いる代表的な10-L発酵から細胞を回収し; フレンチプレスを用いる細胞破壊により無細胞抽出物を調製した。無細胞抽出物、純粋なクレブシエラ・ニューモニアエ1, 3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼ(dhaT)の試料及び分子量標準を未変性勾配ポリアクリルアミドゲルに適用し、その上で移動させた(run out)。次いでゲルを基質1, 3-プロパンジオールとNAD⁺又はエタノールとNAD⁺に暴露した。予想通り、1, 3-プロパンジオールが基質であるゲルにおいては、DhaTに関する活性染色が観察され、それは未変性ゲル上を約340 Kdaにおいて移動した。この活性は純粋なクレブシエラ・ニューモニアエ1, 3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼが適用されたレーンのみで観察された。対照的に、1, 3-プロパンジオールが基質であり、ビタミンB₁₂ 一後無細胞抽出物が適用された場合、約90 Kdaにおいて非特異的触媒活性が観察された。基質としてエタノールが用いら

れると、D h a Tバンドも非—特異的触媒活性バンドも見えず、ビタミンB₁₂ 添加の前及び後に約120K d a lにおいて別のバンドが見いだされた。この新しいバンドは、典型的にはすべての生物において見いだされる、基質としてエタノールに対して特異性を有するアルコールデヒドロゲナーゼを示すのが最もありそうなことである。

【0182】

タンパク質が酵素アッセイ段階の前に分子量によって分離されるこの未変性ゲルアッセイは、活性が低く、E. コリに関して十分に特性化され且つすべての生物で見いだされる、基質としてエタノールに対して特異性を有するアルコールデヒドロゲナーゼと活性が異なっているらしい構築物における1, 3—プロパンジオールの還元の測定で、より高い感度及び精度を与える。デヒドロゲナーゼアッセイは、デヒドロゲナーゼが1, 3—プロパンジオール（又は他のアルコール）からNAD⁺への電子の伝達を触媒するという原理で働く。次いでPMS（フェナジンメトサルフェート）がNADHとゲル中で沈殿を形成するテトラゾリウムブロミド色素（MTT、3—[4, 5—ジメチルチアゾール—2—イル]—2, 5—ジフェニルテトラゾリウムブロミド）の間の電子伝達をカップリングさせる。基質中に数時間から終夜浸した後、ゲルを洗浄して試薬及び可溶性の色素を除去する。ゲル上の活性デヒドロゲナーゼがあるバンドにおいて、不溶性の青い色素が生成する。アッセイの種々の側面がJ o h n s o n a n d L i n（J. B a c t e r i o l. 169:2050（1987））により記載されている。
E. コリにおける非—特異的触媒活性の精製及び同定：

実施例7のK L P 2 3 / p A H 4 8 / p K P 3 2を用いる改良法で記載した典型的な1, 3—プロパンジオール生産実験の最後から収穫した細胞につき、非—特異的触媒活性の大規模な部分的精製を行った。細胞ペレット（16g）を洗浄し、20mL 50mM H e p e s 緩衝液、pH7. 5中に3回再懸濁させた。音波処理により懸濁液中の細胞をライシスさせた。遠心（15分、20, 000 x g、10℃）により無—細胞抽出物を得、氷上で攪拌しながら250mgのプロタミンサルフェートを加えることにより、上澄み液をさらに透明にした。遠心（20分、20, 000 x g、10℃）によって得た上澄み液を、H e p e s

緩衝液を用いて平衡化された Superdex^R 200 分取等級カラム (6 x 60 cm) に通過させることにより分別した。10 mL ずつの画分を集め、それぞれのアリコートをして 10,000 MW カットオフ Centricon^R 膜を用いて 25 分の 1 に濃縮してから、未変性ゲル活性染色によりアッセイした。画分 107-112 において非一特異的触媒活性が同定され、画分 108-109 においてピーク活性が同定された。画分 108 及び 109 のもっと大きなアリコート (7 mL ずつ) を 50 分の 1 に濃縮し、12-レーンの未変性ゲルのすべてのレーン上に負荷した。ゲルを半分に切り、半分をデヒドロゲナーゼ活性に関して染色し、そこには暗青色のバンドが現れ、それは非一特異的触媒活性を示した。未染色のゲルを上から下に染色ゲルと並べ、非一特異的触媒活性のバンドに対応するバンドを未染色ゲル上で切った。ゲルのストリップを粉碎し、粉碎された粒子を 0.5 mL の 2D-負荷緩衝液中に沈め、95℃に5分間加熱し、遠心してゲル粒子を除去することにより、可溶性タンパク質を抽出した。Swiss 2D データベース (<http://www.expasy.ch/ch2d/>; Tonella et al. Electrophoresis 19:1960-1971 (1998)) において E. コリ抽出物の 2D-PAGE のために記載されている条件を用い、2次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (2D-PAGE) のために、上澄み液を等電点電気泳動 (IEF) ストリップ上に負荷した。エレクトロブロッティングによりゲルを PVDF 膜に移した。コロイドブルー (Colloidal blue) ゲル染色を用いて膜をタンパク質に関して染色した。非一特異的触媒活性を同定するために用いられた染色されたブロットを図 6 に示す。アミノ末端ペプチド配列決定のための標準的方法を用いてスポットを同定した。1つのスポット (スポット A) のみがオキシドレダクターゼ活性をコードした。スポット A (図 6) の 19 サイクルは、FASTA 探索機 (search tool) により、推定オキシドレダクターゼ活性を有する E. コリの読み取り枠である yqhD のアミノ末端と 100% の同一性適合 (identity match) を与えた。yqhD によりコードされるタンパク質に関する完全アミノ酸配列を配列番号: 57 に示し; 対応する DNA 配列を配列番号: 58 に示す。yqhD 遺伝子は、おそらく NADH-依存性ブタノールデヒドロゲナ

ーゼ2であるクロスツリジウム中の遺伝子 *adhB* に40%の同一性を有する。

E. コリKL P 2 3中の *yqhD* の遺伝子破壊：

生化学的アッセイ及びアミノ末端アミノ酸配列決定は、非一特異的触媒活性がE. コリ *yqhD* 遺伝子によりコードされるかも知れないことを示唆した。未知の機能のこの遺伝子は仮定的オキシドレダクターゼをコードし、*dhaT* 遺伝子によりコードされるシトロバクテル・フレウンジイ及びクレブシエラ・ニューモニアエ1, 3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼ中にも見いだされる2つのアルコールデヒドロゲナーゼの特徴 (signature) を含有する。

【0183】

この遺伝子を破壊するために、*yqhD* ならびに830bpの5'-フランキングDNA配列及び906bpの3'-フランキングDNA配列をE. コリKL P 2 3 (実施例4) ゲノムDNAから、Taqポリメラーゼ及び以下のプライマーを用いるPCRにおいて増幅した：

(配列番号：59) 5'-GCGGTACCGTTGCTCGACGCTCAGGTTTTTCGG-3'

(配列番号：60) 5'-GCGAGCTCGACGCTTGCCCTGATCGAGTTTTTGC-3'

反応を94℃で1分間、50℃で1分間及び72℃で3分間、35サイクル行い、続いて72℃で5分間、最終的伸長を行った。得られる3.7KbのDNAフラグメントを精製し、SacI及びKpnIで消化し、同様に消化されたp Bluescript II KS (+) (Stratagene) に16℃で16h連結した。連結されたDNAを用いてE. コリDH5α (Gibco/BRL) を形質転換し、X-gal (40μg/mL) 及びアンピシリン (100μg/mL) を含有するLB寒天 (Difco) 上で白いコロニー色を示す形質転換細胞から期待されるプラスミド、pJSP29を単離した。プラスミドpJSP29をAflII及びNdeIで消化し、363bpの*yqhD* 遺伝子及び46bpの3'-フランキングDNA配列を含む409bpのDNAフラグメントを遊離させた。残る5,350bpのDNAフラグメントを精製し、pLoxKan2 (Genencor International, Palo Alto,

CA)からのカナマイシン耐性遺伝子を含有する1,374bpのAflII/NdeI DNAフラグメントに16℃で16h連結した。連結されたDNAを用いてE. コリDH5 α を形質転換し、カナマイシン(50 μ g/mL)を含有するLB寒天培地上で選択された形質転換細胞から期待されるプラスミド、pJSP32-Blueを単離した。プラスミドpJSP32-BlueをKpnI及びSacIで消化し、3,865bpのyqhD破壊カセットを精製し、同様に消化されたpGP704(Miller and Mekalanos, J. Bacteriol. 170:2575-2583(1988))に16℃で16h連結した。連結されたDNAを用いてE. コリSY327(Miller and Mekalanos, J. Bacteriol. 170:2575-2583(1988))を形質転換し、カナマイシン(50 μ g/mL)を含有するLB寒天培地上で選択された形質転換細胞から期待されるプラスミド、pJSP32を単離した。プラスミドpJSP32をE. コリKLP23中に形質転換し、形質転換細胞をカナマイシン(50 μ g/mL)を含有するLB寒天上で選択した。スクリーニングされた200のカナマイシン耐性形質転換細胞の中で、2つが、yqhD破壊カセットによるyqhD遺伝子の置換を生ずる二重交差組換え結果の場合に予測されるアンピシリン感受性表現型を示した。

【0184】

これらの2つの形質転換細胞から単離されるゲノムDNAを鋳型として用い、ならびに以下の組のプライマー対を用いて、PCRによりyqhD遺伝子の破壊を確証した：

1組：

(配列番号：61) 5' -GCGAGCTCGACGCTTGCCCTGATC
GAGTTTTGC-3'

(配列番号：62) 5' -CAGCTGGCAATTCCGGTTCG-3'

2組：

(配列番号：63) 5' -CCCAGCTGGCAATTCCGGTTCGCT
TGCTGT-3'

(配列番号：64) 5' -GGCGACCCGACGCTCCAGACGGAA

GCTGGT-3'

3組：

(配列番号：65) 5'-CCGCAAGATTCACGGATGCATCGT
GAAGGG-3'

(配列番号：66) 5'-CGCCTTCTTGACGAGTTCTGAGCG
GGA-3'

4組：

(配列番号：67) 5'-GGAATTCATGAACAACCTTTAATCT
GCACAC-3'

(配列番号：68) 5'-GTTTGAGGCGTAAAAAGCTTAGCG
GGCGGC-3'

反応はExpand High Fidelity Polymerase (Boehringer Mannheim) 又はTaqポリメラーゼを含有するPlatinum PCR Supermix (Gibco/BRL) を用いて、94℃で1分間、50℃で1分間及び72℃で2分間、35サイクル行い、続いて72℃で5分間最終的伸長を行った。得られるPCR産物を1.0% (w/v) アガロース中におけるゲル電気泳動により分析した。表8にまとめる結果は、両方の形質転換細胞におけるyqhD遺伝子の破壊を確証した。

【0185】

【表9】

表8

プライマーの組	予測されるサイズ(bp)		観察されるサイズ(bp)
	yqhD破壊	yqhD野生型	
1	1,200	産物なし	~1,200
2	1,266	産物なし	~1,266
3	2,594	産物なし	~2,594
4	産物なし	1,189	~900

【0186】

y q h D破壊は、46 b pの3' -フランキンゲン遺伝子間DNA配列を含むy q h Dの3' 末端を欠失させる。欠失は121アミノ酸に対応する363 b pの3' y q h Dコード配列を除去する。停止コドンは、カナマイシン耐性カセット中の残りのy q h Dコード配列の15 b p下流に存在する。

【0187】

プラスミドp AH48及びp KP32をE. コリKLP23 (y q h D⁻) 中に共形質転換し、両方のプラスミドを含有する形質転換細胞をアンピシリン (100 μ g/mL) 及びスペクチノマイシン (50 μ g/mL) を含有するLB寒天上で選択した。代表的な形質転換細胞を、ビタミンB₁₂ の存在下もしくは不在下での10Lの発酵においてグルコースを1, 3-プロパンジオールに転換するその能力に関して調べた。

E. コリ株KLP23/p AH48/p KP32における有意な1, 3-プロパンジオール生産にy q h Dが必要であることの立証:

1, 3-プロパンジオール生産へのy q h D破壊の影響に関して調べるために、E. コリ株KLP23 (y q h D⁻) /p AH48/p KP32を用い、本質的に実施例7に記載した通りに1, 3-プロパンジオールの生産のための発酵を行った。

【0188】

非-特異的触媒活性のノックアウト、E. コリ株KLP23 (y q h D⁻) /p AH48/p KP32を用いる代表的10-L発酵を表9に示す。OD₅₅₀ が3.0 Aを越えた時に(10.4 h) ビタミンB₁₂ を添加するまで、生物は安定して細胞塊及びグリセロールを堆積させた。ビタミンB₁₂ を10.4 hに8 mgのボラス添加として与え、その後ビタミンB₁₂ を1.32 m h/hの速度で連続的に供給した。B₁₂ の添加に続く4 h以内に、グルコース消費が遅くなり、酸素使用速度が低下し、光学濃度におけるさらなる向上はなかった。グルコースの発酵が止まり、タンク中のグルコース濃度が蓄積した。得られた1, 3-プロパンジオールの最高の力価は0.41 g/Lであった。アンピシリン及びスペクチノマイシンを含有する寒天平板上で細胞の希釈系列を平板培養することにより、生物をその生存率に関して調べた。平板を30℃のインキュベーター中で24 hイ

ンキュベーションした。E. コリ K L P 2 3 (y q h D⁻) / p A H 4 8 / p K P 3 2 の発酵からの平板上に生存コロニーはなかった、表 1 1。

【0189】

対照的に、ビタミンB₁₂を加えなかった対照標準タンクからの細胞懸濁液は、グルコース供給溶液の完全な添加の故に10-Lタンクが満たされるまで、細胞塊及びグリセロールを生じ続けた(表10)。この発酵の最後における細胞懸濁液の希釈系列による寒天平板生存率決定は、光学濃度値により見積もられる合計細胞数と一致する生存細胞カウントを示した(表11)。

【0190】

【表10】

表9

E.コリ株KLP23(yqhD⁻)/pAH48/pKP32を用いるグルコースの1,3-プロパンジオール(1,3-PD)への失敗した転換の代表的な発酵の概略

時間(h)	OD ₅₅₀ (AU)	DO (%)	グルコース(g/L)	グリセロール(g/L)	1,3-PD (g/L)
0	0.4	150	11.3	0.05	0
2.3	3.0	134	10.7	0.13	0
4.3	10.8	85.0	8.2	1.41	0
8.3	23.1	81.8	0.9	10.0	0
16.3	37.2	149	13.1	21.4	0.41
18.3	47.6	149	18.9	21.6	0.39
20.3	39.6	149	24.4	22.3	0.42
23.8	33.6	149	25.4	22.0	0.41

【0191】

【表11】

表10

E.コリ株KLP23(yqhD⁻)/pAH48/pKP32を用いるグルコースのグリセロールへの
転換の代表的な発酵の概略

時間(h)	OD ₅₅₀ (AU)	DO (%)	グルコース(g/L)	グリセロール(g/L)
0	0.2	148	9.5	0.06
2.2	2.8	128	8.9	0.13
4.2	10.4	58.5	7.0	1.4
8.2	21.6	57.6	2.7	11.2
16.2	76.8	10.7	0	40.5
20.2	117	10.2	0	52.9
23.7	154	8.5	0	63.9
36.2	239	10.1	0.1	122

【0192】

【表12】

表11

ビタミンB₁₂の不在下及び存在下においてE.コリ株KLP23(yqhD⁻)/pAH48/
pKP32を用いるグルコースの発酵の終点からの生存率平板カウントの代表的な概略

ビタミンB ₁₂	終点における時間(h)	OD ₅₅₀ (AU)	生存カウント(cfu/mL)
なし	36.2	239	2.1E11
あり	23.8	33.6	0
あり	23.8	41.2	0

【0193】

【表13】

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>12</u> , line <u>18</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
Name of depositary institution AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION	
Address of depositary institution (including postal code and country) 10801 University Blvd. Manassas, Virginia 20110-2209 USA	
Date of deposit 18 April 1995	Accession Number ATCC 69789
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
In respect of those designations in which a European patent is sought, a sample of the deposited microorganism will be made available until the publication of the mention of the grant of the European patent or until the date on which the application has been refused or withdrawn or is deemed to be withdrawn, only by the issue of such a sample to an expert nominated by the person requesting the sample. (Rule 28(4) EPC)	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only <input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application Authorized officer	For International Bureau use only <input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on: Authorized officer

Form PCT/RO/134 (July 1992)

【0194】

【表14】

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>12</u> , line <u>22</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
Name of depositary institution AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION	
Address of depositary institution (including postal code and country) 10801 University Blvd. Manassas, Virginia 20110-2209 USA	
Date of deposit 18 April 1995	Accession Number ATCC 69790
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
In respect of those designations in which a European patent is sought, a sample of the deposited microorganism will be made available until the publication of the mention of the grant of the European patent or until the date on which the application has been refused or withdrawn or is deemed to be withdrawn, only by the issue of such a sample to an expert nominated by the person requesting the sample. (Rule 28(4) EPC)	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
<div style="text-align: center; border-bottom: 1px solid black; margin-bottom: 5px;">For receiving Office use only</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-top: 5px;"> Authorized officer </div>	<div style="text-align: center; border-bottom: 1px solid black; margin-bottom: 5px;">For International Bureau use only</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on: </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-top: 5px;"> Authorized officer </div>

Form PCT/RO/134 (July 1992)

【0195】

【表15】

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>12</u> , line <u>30</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
Name of depositary institution AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION	
Address of depositary institution (including postal code and country) 10801 University Blvd. Manassas, Virginia 20110-2209 USA	
Date of deposit 25 November 1997	Accession Number ATCC 98597
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
In respect of those designations in which a European patent is sought, a sample of the deposited microorganism will be made available until the publication of the mention of the grant of the European patent or until the date on which the application has been refused or withdrawn or is deemed to be withdrawn, only by the issue of such a sample to an expert nominated by the person requesting the sample. (Rule 28(4) EPC)	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	

<p style="text-align: center;">For receiving Office use only</p> <p><input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application</p> <p>Authorized officer</p>	<p style="text-align: center;">For International Bureau use only</p> <p><input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:</p> <p>Authorized officer</p>
--	---

Form PCT/RO/134 (July 1992)

【0196】

【表16】

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>12</u> , line <u>27</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
Name of depositary institution AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION	
Address of depositary institution (including postal code and country) 10801 University Blvd. Manassas, Virginia 20110-2209 USA	
Date of deposit 25 November 1997	Accession Number ATCC 98598
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
In respect of those designations in which a European patent is sought, a sample of the deposited microorganism will be made available until the publication of the mention of the grant of the European patent or until the date on which the application has been refused or withdrawn or is deemed to be withdrawn, only by the issue of such a sample to an expert nominated by the person requesting the sample. (Rule 28(4) EPC)	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States) 	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable) The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
<div style="text-align: center; border-bottom: 1px solid black; margin-bottom: 5px;">For receiving Office use only</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-top: 5px;"> Authorized officer </div>	<div style="text-align: center; border-bottom: 1px solid black; margin-bottom: 5px;">For International Bureau use only</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on: </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-top: 5px;"> Authorized officer </div>

Form PCT/RO/134 (July 1992)

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> E.I. du Pont de Nemours and Company

<120> Improved Process for the Biological Production of 1,3-Propanediol with High Titer

<130> BC1020 PCT

<140>

<141>

<150> 60/149,534

<151> 1999-08-08

<160> 68

<170> Microsoft Office 97

<210> 1

<211> 12145

<212> DNA

<213> *Klebsiella pneumoniae*

<400> 1

gtcgaccacc	acggtggtga	ctttaatgcc	gctctcatgc	agcagctcgg	tggcgggtctc	60
aaaattcagg	atgtgcgcgg	tatagttttt	gataatcagc	aagacgcctt	cgccgcgcgtc	120
aatttgcatc	gcgcattcaa	acattttgtc	cggcgtcggc	gaggtgaata	tttcccccg	180
acaggcgccg	gagagcatgc	cctggccgat	atagccgcag	tgcacgggtt	catgtccgct	240
gccgccgcgg	gagagcaggg	ccaccttgcc	agccaccggc	gcgtcgggtc	gggtcacata	300
cagcgggtcc	tgatgcaggg	tcagctgcgg	atgggcttta	gccagccctt	gtaattgttc	360
attcagtaca	tcttcaacac	ggttaatcag	cttttcatt	attcagtgc	ccgttggaga	420
aggttcgtg	ccgcctctct	gctggcggag	gcggtcatcg	cgtaggggta	tcgtctgacg	480
gtggagcgtg	cctggcgata	tgatgattct	ggctgagcgg	acgaaaaaaa	gaatgccccg	540
acgatcgggt	ttcattacga	aacattgctt	cctgattttg	tttctttatg	gaacgttttt	600
gctgaggata	tggtgaaaat	gcgagctggc	gcgctttttt	tcttctgcca	taagcggcgg	660
tcaggatagc	cggcgaagcg	ggtgggaaaa	aattttttgc	tgattttctg	ccgactgcgg	720
gagaaaaagg	ggtcaaacac	ggaggattgt	aagggcatta	tgccggcaag	gagcggatcg	780
ggatcgcaat	cctgacagag	actagggttt	tttgttccaa	tatggaacgt	aaaaaattaa	840
cctgtgtttc	atatcagaac	aaaaaggcga	aagatttttt	tgttccctgc	cgccctaca	900
gtgatcgcac	tgctccggta	cgctccgttc	aggccgcgct	tcactggccg	gcgcggataa	960
cgccagggtc	catcatgtct	acatgcgcac	ttatttgagg	gtgaaaaggaa	tgctaaaagt	1020
tattcaatct	ccagccaaat	atcttcaggg	tcctgatgct	gctgttctgt	tcggtcaata	1080
tgccaaaaac	ctggcgagga	gcttcttctg	catcgctgac	gatttcgtaa	tgaaactggc	1140
gggagagaaa	gtggtgaatg	gcctgcagag	ccacgatatt	cgctgccatg	cggaacgggt	1200
taacggcgaa	tgacgcatg	cggaatcaa	ccgtctgatg	gcgattttgc	aaaaacaggg	1260
ctgccgcggc	gtggtcgga	tcggcggtgg	taaaaccctc	gataccgcga	aggcgatcgg	1320
ttactaccag	aagctgcgg	tggtggtgat	cccgaaccatc	gcctcgaccg	atgcgccaac	1380
cagcgcgctg	tcggtgatct	acaccgaagc	gggcgagttt	gaagagtatc	tgatctatcc	1440
gaaaaacctg	gatatggtgg	tgatggacac	ggcgattatc	gccaaaagcg	cggtacgcct	1500
gctggtctcc	ggcatgggcg	atgcgctctc	cacctggttc	gaggccaaag	cttgctacga	1560
tcgcgcgcgc	accagcatgg	ccggaggaca	gtccaccgag	gcggcgctga	gcctcgcccg	1620
cctgtgctat	gatacgctgc	tgccggaggg	cgaaaaggcc	cgctcgccgg	cgcaggcccg	1680
ggtagtgaac	gaagcgctgg	agcgcacatc	cgaggcgaac	acttacctca	gcggcattgg	1740
ctttgaaagc	agtggcctgg	ccgctgcccc	tgcaatccac	aacggtttca	ccattcttga	1800
agagtgccat	oacctgtatc	acggtgagaa	agtggccttc	ggtaccctgg	cgcagctgg	1860
gctgcagaac	agcccgatgg	acgagattga	aacggtgcag	ggcttctgcc	agcgcgtcgg	1920
cctgcgcggtg	acgctcgcgc	agatgggcgt	caaagagggg	atcgacgaga	aaatcgccgc	1980
ggtggcgaaa	gctacctgcg	cggaaggggg	aacctccat	aatatgccgt	ttgcggtgac	2040
cccggagagc	gtccatgccg	ctatcctcac	cgccgatctg	ttaggccagc	agtggctggc	2100
gcgttaattc	gcggtggcta	aacgcgtggc	ccaggtcagc	ggtttttctt	tctccctcc	2160
ggcagtcgct	gccggagggg	ttctctatgg	tacaacgcgg	aaaaggatat	gactgttcag	2220
actcaggata	ccgggaaggc	ggtctcttcc	gtcattgccc	agtcatggca	ccgctgcagc	2280
aagtttatgc	agcgcgaaac	ctggcaaacg	ccgcaccagg	cccagggcct	gaccttcgac	2340

tccatctgtc	ggcgtaaaac	cgcgctgctc	accatcgggc	aggcgggcgt	ggaagacgcc	2400
tgggagttta	tggacggcgc	cccttgccgc	ctgtttattc	ttgatgagtc	cgccctgcac	2460
ctgagccgtt	gcgccgagcc	gcaaaccttg	gcccagctgg	ctgccctggg	atttcgcgac	2520
ggcagctatt	gtgcggagag	cattatcggc	acctgcgcgc	tgctgctggc	cgcgatgcag	2580
ggccagccga	tcaacacccg	cggcgatcgg	cattttaagc	aggcgctaca	gccatggagt	2640
ttttgctcga	cgccggtgtt	tgataaccac	ggcggtgtgt	tcggctctat	ctcgctttgc	2700
tgtctggtcg	agcaccagtc	cagcgccgac	ctctccctga	cgctggccat	cgcccgcgag	2760
gtgggtaact	ccctgcttac	cgacagcctg	ctggcggaat	ccaaccgtca	cctcaatcag	2820
atgtacggcc	tgctggagag	catggacgat	gggtgatggg	cgtagaacga	acagggcggtg	2880
ctgcagtttc	tcaatgttca	ggcgccgaga	ctgctgcac	ttgatgctca	ggccagccag	2940
gggaaaaata	tcgccgatct	ggtgaccttc	ccggcgctgc	tgccgcgcgc	catcaaacac	3000
gcccgcggcc	tgaatcacgt	cgaagtacac	tttgaagtc	agcatcagtt	tgctgatgcg	3060
gtgatcacct	taaaaccgat	tgctgagggc	caaggcaaca	gttttattct	gctgctgcac	3120
ccggtggagc	agatgcggca	gctgatgacc	agccagctcg	gtaaagtacg	ccacaccttt	3180
gagcagatgt	ctgccgacga	tcgggaaacc	cgacgcctga	tccactttgg	ccgccaggcg	3240
gcgcgcggcg	gcttcccggt	gctactgtgc	ggcgaaagag	gggtcgggaa	agagctgctg	3300
agccaggcta	ttcacaatga	aagcgaaacg	gcggcgggcc	cctacatctc	cgtaaatctg	3360
cagctatatg	ccgacagcgt	gctgggccag	gactttatgg	gcagcgcccc	taccgacgat	3420
gaaaatgggt	gcctgagccg	ccttgagctg	gccaacggcg	gcaccctgtt	tctggaaaag	3480
atcgagtatc	tggcgccgga	gctgcagtcg	gctctgctgc	agggtattaa	gcagggcggtg	3540
ctcaccggcc	tcgacgcccc	gcgcctgac	ccggtggatg	tgaaggtgat	tgccaccacc	3600
accgtcgatc	tggccaatct	ggttgaacag	aaccgcttta	gccgccagct	gtactatgcg	3660
ctgcaactcct	ttgagatcgt	catcccgccc	ctgcgcgcgc	gacgcaacag	tattcgtcgc	3720
ctggtgcata	accggttgaa	gagcctggag	aagcgtttct	cttcgcgact	gaaagtggac	3780
gatgacgcgc	tggcacagct	ggtggcctac	tcgtggcccg	ggaatgattt	tgagctcaac	3840
agctgcattg	agaatatcgc	catcagcagc	gacaacggcc	acattcgctc	gagtaactctg	3900
ccggaatata	tcttttccga	gcggccgggc	ggggatagcg	cgatcatcgt	gctgcggccc	3960
agcctgactt	ttagcgccat	cgaaaaggaa	gctattatct	acgcgcgcgc	ggtgaccagc	4020
ggcggggtgc	aggagatgct	gcagctgctc	aatatcgccc	gcaccacctc	gtggcgcaaa	4080
atgaagcagt	acgatattga	cgccagccag	ttcaagcgca	agcatcaggc	ctagtctctt	4140
cgattcgcgc	catggagaac	aggccatccg	acaggcgatt	gctgtagcgt	ttgagcgctg	4200
cgcgagcgcg	atgcgcgcgc	tcagcaggcg	gattcctccc	ttcgagccga	cgggactggg	4260
tgccgcgccac	gtgcagctgg	gcagaggcga	gattcctccc	cgggatcacg	aactgtttta	4320
acggcgccgt	ctcgcccata	ttgcggtcga	taagccgctc	caggggcggtg	atctcctctt	4380
cgccgatcgt	ctggctcagg	cggttcaggc	cccgcgcatc	gctggccagt	tcagccccca	4440
gcacgaacag	cgtctgctga	atatggtgca	ggctttcccg	cagcccgggc	tcgcgggtcg	4500
tggcgtagca	gacgcccagc	tgggatatca	gttcatcgac	ggtgccgtag	gcctcgagcg	4560
gaatatggct	tttctcgatg	ccgctgcccc	cgtacagggc	ggtggtgcct	ttatcccccg	4620
tgccgggtata	gatacgatac	attcagtttc	tctcacttaa	cgccaggact	ttaaccagct	4680
gcccgcggtt	ggcgccgagc	gtacgcagtt	gatcgtcgct	atcggtgacg	tgctccgtag	4740
ccagcgggcg	gtccgcgggc	agctgggcat	gagtgagggc	tatctcgccg	gacgcgctga	4800
ccccgatacc	cacccgcagg	ggcgagcttc	tgcccgccag	ggcgcccgag	gcagcgcgct	4860
caaccgctcc	gtcataggtt	atggtctggc	aggggacccc	ctgctcctcc	agcccccagc	4920
acagctcatt	gatggcgccg	gcattggtgc	cgcccggtatc	gtaaaacagg	cgtaacgctg	4980
cggttgaaag	cgacatgacg	gtccctcgtc	taacactcag	aatgcctggc	ggaaaatcgc	5040
ggcaatctcc	tgctogttgc	ctttacgcgg	gttcgagaa	gcattgccgt	cttttagagc	5100
catctccgcc	atgtagggga	agtcggcctc	ttttaccccc	agatcgcgca	gatgctgcgg	5160
aataccgata	tccatcgaca	gacgcgtgat	agcgcgcatg	gctttttccg	ccgcgtcgag	5220
agtggacagt	ccggtgatata	tttcgcccat	cagttcagcg	atatcggcga	atttctccgg	5280
gttggcgatc	aggttgtagc	gcgccacatg	cgccagcagg	acagcgttgg	ccagccgctg	5340
cgccatgtcg	tacaggccgc	ccagctggtg	cgccatggcg	tgacgtagc	cgaggttggc	5400
gttattgaaa	gccatcccgc	ccagcagaga	agcataggcc	atgttttccc	gcgcctgcag	5460
attgctgccc	agggccacgg	cctggcgagc	gttgccggcg	atgaggcgga	tcgcctgcac	5520
ggcgcgccgc	tcggtcaccc	ggtttagcgt	tttgagagata	taggcctcta	cgcggtgggt	5580
cagggcaccc	atcccggctg	ccgcggtcag	ggcgccgggt	ttaccgatca	tcagcagtg	5640
atcggtgata	gagaccgacg	gcagtttgcg	ccagctgacg	atcacaactc	tcactttggt	5700
ttcggtgttg	gtcaggagcg	agtggcggtg	gacctcgctg	cggtgcccgg	cggtgggtatt	5760
gaccgcgacg	ataggcgcca	gcgggttggg	cagggtctcg	attccggcat	actggtacag	5820
atcgccctca	tgggtggcgg	cgatgccgat	gcctttgccc	caatcgtgcg	ggctgcccgc	5880
gcccacggtg	acgatgatgt	cgcaactgtc	gcggcgaaac	acggcgaggc	cgctcgcgac	5940
gttgggtgtc	ttcggggttc	gctcgacgcc	gtcaaagatc	gccacctoga	tcggcgccct	6000
ccgcagataa	tgcaagggtt	tgctccaccg	gccatcttta	attgcccgcg	ggcctttgtc	6060
ggtgaccagc	agggtctttt	tcccccccag	cagctggcag	cgttcgccga	ctacggaaat	6120
ggcgttgggg	ccaaaaaagt	taacgtttgg	caccagataa	tcaaacatac	gtagctcat	6180

aatatacctt	ctcgcttcag	gttataatgc	ggaaaaacaa	tccaggggcg	actgggctaa	6240
taattgatcc	tgctcgaccg	taccgcccgt	aacgcccagc	gogccaatta	cctgctcatt	6300
aaaaataa	ggcaggccgc	cgccaaaaat	aataattcgc	tggttggttg	ttagctgcag	6360
accgtacaga	gattgtcctg	gctggaccgc	tgacgtaatt	tcatgggtac	cttgcttcag	6420
gctgcaggcg	ctccaggctt	tattcaggga	aatatcgag	ctggagacga	aggcctcgtc	6480
catccgctgg	ataagcagcg	tggtgcctcc	gcggtcaact	acggaaaaca	ccaccgccac	6540
gttgatctca	gtggcttttt	ttccaccgc	cgccgccatt	tgctggggcg	cgccagggt	6600
gattgtctga	acttggtggc	tctgttcat	cattctctcc	ogcaccagga	taacgctggc	6660
gcgaatagtc	agtagggggc	gatagtaaaa	aactattacc	attcggttg	cttgctttat	6720
ttttgtcagc	gttattttgt	cgcccgccat	gatttagtca	atagggttaa	aatagcgtcg	6780
gaaaaacgta	attaagggcg	ttttttatta	attgatttat	atcattggcg	gcgatacacat	6840
tttttatttt	tgccgcccga	gtaaagtttc	atagtgaaac	tgctcggtaga	tttcgtgtgc	6900
caaattgaaa	cgaaattaaa	tttatttttt	tcaccactgg	ctcattttaa	gttcgcgtat	6960
tgccgggta	ggccggggcg	caacgacgct	ggccggcgct	attcgctacc	gtctgcggat	7020
ttcacctttt	gagccgatga	acaatgaaaa	gatcaaaacg	atttgagta	ctggcccagc	7080
gccccgtcaa	tcaggacggg	ctgattggcg	agtggcctga	agaggggctg	atcgccatgg	7140
acagcccctt	tgaccgggtc	tcttcagtaa	aagtggacaa	cggtctgac	gtcgaactgg	7200
acggcaaacg	ccgggaccag	tttgacatga	tcgaccgatt	tatcgccgat	tacgcgatca	7260
acgttgagcg	cacagagcag	gcaatgcgcc	tggaggcggt	ggaaatagcc	cgtatgctgg	7320
tggatattca	cgtcagccgg	gaggagatca	ttgccatcac	taccgccatc	acgcccggca	7380
aagcgggtcga	ggtgatggcg	cagatgaacg	tggtgagat	gatgatggcg	ctgcagaaga	7440
tgcggtgccc	ccggaccccc	tccaaccagt	gccacgtcac	caatctcaaa	gataatccgg	7500
tgagatttgc	cgctgacggc	gcccaggccg	ggatccggcg	cttctcagaa	caggagacca	7560
cggtcggtat	cgcgcgctac	gcgcccgtta	acgcccgtgc	gctgttggtc	ggttcgcagt	7620
cgggccggcc	cgcgctgttg	acgcagtgct	cggtgggaaga	ggccaccgag	ctggagctgg	7680
gcattgcgtg	cttaaccagc	tacgcccaga	cggtgtcggt	ctacggcacc	gaagcggtat	7740
ttaccgacgg	cgatgatacg	ccgtggtcaa	aggcgcttct	cgcttcggcc	tacgcctccc	7800
gcgggttgaa	aatgcgctac	acctccggca	ccggatccga	agcgctgatg	ggctattcgg	7860
agagcaatgc	gatgctctac	ctcgaatcgc	gctgcatctt	cattactaaa	ggcgccgggg	7920
ttcagggaact	gcaaaacggc	gcggtgagct	gtatcgccat	gaccggcgct	gtgcgctgg	7980
gcatttcggg	ggtgctggcg	gaaaaacctga	tcgcctctat	gctcgacctc	gaagtggcgt	8040
ccgccaacgg	cgagactttc	tccactcgg	atattcgccg	caccgcgcgc	accctgatgc	8100
agatgctgcc	gggcaccgac	tttattttct	ccggtacag	cgcggtgccc	aactacgaca	8160
acatgttcgc	cggtcgaac	ttcgatgcgg	aagattttga	tgattacaac	atcctgcagc	8220
gtgacctgat	ggttgacggc	ggcctgcgtc	cggtgaccga	ggcggaaac	attgccattc	8280
gccagaaaag	ggcgcgggcg	atccaggcg	ttttccgga	gctggggctg	ccgccattcg	8340
ccgacgagga	ggtgagggcc	gccacctacg	cgcacggcag	caacgagatg	ccgcccgcga	8400
acgtggtgga	ggatctgagt	gcggtggaag	agatgatgaa	gcgcaacatc	accggcctcg	8460
atattgtcgg	cgcgctgagc	cgcagcggtc	ttgaggatat	cgccagcaat	attctcaata	8520
tgctgcgcga	gcgggtcacc	ggcgattacc	tgacgacctc	ggccattctc	gatcggcagt	8580
tcgagggtgt	gagtgcggtc	aacgacatca	atgactatca	ggggccgggc	accggctatc	8640
gcattctctg	cgaacgctgg	gcggagatca	aaaatattcc	ggcggtggtt	cagcccgcga	8700
ccattgaata	aggcggtatt	cctgtgcaac	agacaaccca	aattcagccc	tcttttacc	8760
tgaaaaaccc	cgagggcggg	gtagcttctg	ccgatgaacg	cgccgatgaa	gtggtgatcg	8820
gcgtcgggcc	tgccctcgat	aaacaccagc	atcacactct	gatcgatatg	ccccatggcg	8880
cgatcctcaa	agagctgatt	gcccgggtgg	aagaagaggg	gcttcacgcc	cggttggtgc	8940
gcattctgcg	cacgtccgac	gtctccttta	tggcctggga	tgccggccaac	ctgagcggct	9000
cggggatcgg	catcggtatc	cagtcgaagg	ggaccacggg	catccatcag	cgcgatctgc	9060
tgccgctcag	caacctggag	ctgttctccc	aggcgccgct	gctgacgctg	gagacctacc	9120
ggcagattgg	caaaaaacgct	gcgcgctatg	cgcgcaaaaga	gtcaccttcg	ccggtgccgg	9180
tgggtgaacga	tcagatgggtg	cgcccgaaat	ttatggccaa	agcccgcgta	tttcatatca	9240
aagagaccga	acatgtgggtg	caggacggcg	agcccgctcac	cctgcacatc	gacttagtaa	9300
gggagtgacc	atgagcgaga	aaaccatgcg	cgtgcaggat	tatccgttag	ccaccgcgtg	9360
cccggagcat	atcctgacgc	ctaccggcaa	accattgacc	gatattaccc	tcgagaaggt	9420
gctctctggc	gaggtggggc	cgcaggatgt	gcggatctcc	cgccagaccc	ttgagtacca	9480
ggcgagagat	gcccagcaga	tcgagcgcca	tgcggtggcg	cgcaatttcc	gcccgcgggc	9540
ggagcttatc	gccattctcg	acgagcgcat	tctggctatc	tataacgcgc	tgcccccgtt	9600
ccgctcctcg	caggcgagac	tgctggcgat	cgccgacgag	ctggagcaca	cctggcatgc	9660
gacagtgaat	gcccgcctttg	tccgggagtc	ggcggaagtg	tatcagcagc	ggcataagct	9720
gcgtaaaagg	agctaagcgg	aggtcagcat	gccgttaata	gcccggattg	atatcggcga	9780
cgccaccacc	gaggtggcgc	tggcgtccga	ctaccgcgag	gcgagggcgt	ttgttgccag	9840
cgggatcgct	gcgacgacgg	gcattgaaag	gacgcgggac	aatatcgccg	ggaccctcgc	9900
cgcgctggag	cagggccctgg	cgaaaaacacc	gtggtcgatg	agcgatgtct	ctcgcatcta	9960
tcttaacgaa	gcccgcgccg	tgattggcga	tgtggcgatg	gagaccatca	ccgagaccat	10020

tatcaccgaa tcgaccatga tcggtcataa cccgcagacg cggggcgggg tgggcgttgg 10080
 cgtgggggacg actatcgccc tcggggcggt ggcgacgctg ccggcgggcg agtatgccga 10140
 ggggtggatc gtactgattg acgacgccgt cgatttcctt gacgccgtgt ggtggctcaa 10200
 tgaggcgctc gaccggggga tcaacgtggt ggcggcgatc ctcaaaaagg acgacggcgt 10260
 gctggtgaac aaccgcctgc gtaaaaccct gccggtggtg gatgaagtga cgctgctgga 10320
 gcaggtcccc gagggggtaa tggcggcggt ggaagtggcc gcgccgggac aggtggtgag 10380
 gatcctgtcg aatccctacg ggatcgccac cttcttcggg ctaagcccg aagagacca 10440
 ggccatcgct cccatcgccc gcgccctgat tggcaaccgt tccgcggtgg tgctcaagac 10500
 cccgcagggg gatgtgcagt cgcgggtgat cccggcgggc aacctctaca ttagcggcga 10560
 aaagcgccgc ggagaggcgg atgtcgccga gggcgcgga gccatcatgc aggcgatgag 10620
 cgcctgcgct ccgggtacgc acatccgcgg cgaaccgggc acccacgcgg gcggcatgct 10680
 tgagcgggtg cgcaaggtaa tggcgctcct gaccggccat gagatgagcg cgatatacat 10740
 ccaggatctg ctggcggtgg atacgtttat tccgcgcaag gtgcaggcg ggatggccgg 10800
 cgagtgcgcc atggagaatg ccgtcgggat ggcggcgatg gtgaaagcgg atcgtctgca 10860
 aatgcaggtt atcgcccgcg aactgagcgc ccgactgcag accgaggtgg tgggtggcg 10920
 cgtggaggcc aacatggcca tcgcgggggc gtttaaccact ccgggctgtg cggcgccgct 10980
 ggcgatcctc gacctcggcg ccggctcgac ggatgcggcg atcgtcaacg cggaggggca 11040
 gataacggcg gtccatctcg ccggggcggg gaatatggtc agcctgttga ttaaaaccga 11100
 gctgggcctc gaggatcttt cgctggcgga agcgataaaa aaataaccgc tggccaaagt 11160
 ggaaagcctg ttcagtattc gtcacgagaa tggcgcggtg gaggttcttc gggaagccct 11220
 cagcccggcg gtgttcgcca aagtgggtga catcaaggag ggcgaactgg tgccgatcga 11280
 taacgcccag ccgctggaaa aaattcgtct cgtgcgcggg caggcgaaa agaaagtgtt 11340
 tgtcaccaac tgccctgcgc cgctgcgcca ggtctcaccg ggcggttcca ttccgatat 11400
 cgcctttgtg gtgctggtgg gcggtcatc gctggacttt gagatcccg agcttatcac 11460
 ggaagccttg tcgactatg gcgtggtcgc cgggcagggc aatattcggg gaacagaagg 11520
 gccgcgcaat gcggtcgcca ccgggctgct actggccggg caggcgaatt aaacgggcgc 11580
 tcgcgccagc ctctctcttt aacgtgctat ttcaggatgc cgataatgaa ccagacttct 11640
 accttaaccg ggcagtcgct ggccgagttt cttggcaacc gattgctcat tttcttcggc 11700
 gcgggctgcg tcgctgcgt gcgggtcgcc ggggccagct ttggtcagt ggagatcagt 11760
 attatctggg gccttgcggt cgccatggcc atctacotga cggccggtgt ctccggcgcg 11820
 cacctaaatc cggcggtgac cattgccctg tggctgttcg cctgttttga acgcccgaag 11880
 gtgtgcccgt ttattgttgc ccagacggcc ggggccttct gcgcccgcgc gctggtgat 11940
 gggctctatc gccagctgtt tctcgatctt gaacagagtc agcatatcgt gcgcggcact 12000
 gccgcagtc ttaacctggc cggggtcttt tccacgtacc cgcattccca tatcactttt 12060
 atacaagcgt ttgccgtgga gaccaccatc acggcaatcc tgatggcgat gatcatggcc 12120
 ctgaccgacg acggcaacgg aattc 12145

<210> 2
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Unknown

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
 <223> primer

<400> 2
 gctttctgtg ctgcggcttt ag 22

<210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
 <223> primer

<400> 3
 tggtcgagga tccacttcac ttt 23

<210> 4
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <220>
 <223> primer

 <400> 4
 aaagtgaagt ggatcctcga ccaattggat ggtggcgag tagcaaaca t 51

 <210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <220>
 <223> primer

 <400> 5
 ggatcaccgc cgcagaaact acg 23

 <210> 6
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <220>
 <223> primer

 <400> 6
 ctgtcagccg ttaagtgtc ctgtg 25

 <210> 7
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <220>
 <223> primer

 <400> 7
 cagttcaacc tgttgatagt acg 23

 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
 <223> primer

 <400> 8
 atgagtcaaa catcaacctt 20

 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <220>
 <223> primer

 <400> 9
 atggagaaaa aaatcactgg 20

 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <220>
 <223> primer

 <400> 10
 ttacgccccg ccctgccact 20

 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <220>
 <223> primer

 <400> 11
 tcagaggatg tgcacctgca 20

 <210> 12
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <220>
 <223> primer

 <400> 12
 cgagcatgcc gcatttgga ctactc 26

<210> 13
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <220>
 <223> primer

 <400> 13
 gcgtctagag taggttatcc ccactcttg 29

 <210> 14
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <220>
 <223> primer

 <400> 14
 gaagtcgacc gctgcgccctt atccgg 26

 <210> 15
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <220>
 <223> primer

 <400> 15
 cgcgtcgacg tttaacaattt caggtggc 28

 <210> 16
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <220>
 <223> primer

 <400> 16
 gcagcatgct ggactggtag tag 23

 <210> 17
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
 <223> primer

 <400> 17
 cagtctagag ttattggcaa acctacc 27

 <210> 18
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <220>
 <223> primer

 <400> 18
 gatgcatgcc cagggcggag acggc 25

 <210> 19
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <220>
 <223> primer

 <400> 19
 ctaacgattg ttctctagag aaaatgtcc 29

 <210> 20
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <220>
 <223> primer

 <400> 20
 cacgcatgca gttcaacctg ttgatagtac 30

 <210> 21
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <220>
 <223> primer

 <400> 21
 gcgtctagat ccttttaaata taaaaatg 28

 <210> 22
 <211> 51

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <220>
 <223> primer

 <400> 22
 gcgcggatcc aggagtctag aattatggga ttgactacta aacctctatc t 51

 <210> 23
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <220>
 <223> primer

 <400> 23
 gatacgcccg gggtaccatt tcaacagatc gtcctt 36

 <210> 24
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <220>
 <223> primer

 <400> 24
 ttgataatat aacctggct gctgctgctg atag 34

 <210> 25
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <220>
 <223> primer

 <400> 25
 gtatgatatg ttatcttgga tccaataaat ctaatcttc 39

 <210> 26
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <220>
 <223> primer

<400> 26
 catgactagt aaggaggaca attc 24
 <210> 27
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <220>
 <223> primer
 <400> 27
 catggaattg tcctccttac tagt 24
 <210> 28
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <220>
 <223> primer
 <400> 28
 ctagtaagga ggacaattc 19
 <210> 29
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <220>
 <223> primer
 <400> 29
 catggaattg tcctcctta 19
 <210> 30
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <220>
 <223> primer
 <400> 30
 gatccaggaa acaga 15
 <210> 31
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 31
ctagtctgtt tcctg 15

<210> 32
<211> 94
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: terminator
sequence

<220>
<223> terminator sequence

<400> 32
agcttaggag tctagaatat tgagctcgaa ttcccgggca tgcggtaccg gatccagaaa 60
aaagcccgca cctgacagtg cgggcttttt tttt 94

<210> 33
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 33
ggaattcaga tctcagcaat gagcgagaaa accatgc 37

<210> 34
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 34
gctctagatt agcttccttt acgcagc 27

<210> 35
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

```

<400> 35
 ggccaagctt aaggaggta attaaatgaa aag 33
 <210> 36
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <220>
 <223> primer
 <400> 36
 gctctagatt attcaatggt gtcggg 26
 <210> 37
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <220>
 <223> primer
 <400> 37
 gcgcctcta gaattatgag ctatcgtatg ttgattatc tg 42
 <210> 38
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <220>
 <223> primer
 <400> 38
 tctgatacgg gatcctcaga atgcctggcg gaaaat 36
 <210> 39
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: linker
 <220>
 <223> linker
 <400> 39
 tcgacgaatt caggagga 18
 <210> 40
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: linker

<220>
 <223> linker

<400> 40
 ctagtctctcc tgaattcg

18

<210> 41
 <211> 4549
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: pCL1920

<220>
 <223> plasmid

<400> 41
 agctcgtcag cgggtgttgg cgggtgtcgg ggctggctta actatgcggc atcagagcag 60
 attgtactga gagtgcacca tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa 120
 taccgcatca ggcgccattc gccattcagg ctgcgcaact gttgggaagg gcgatcgggtg 180
 cgggcctctt cgctattacg ccagctggcg aaagggggat gtgctgcaag gcgattaagt 240
 tgggtaacgc cagggttttc ccagtcacga cgttgtaaaa cgacggccag tgaattcgag 300
 ctcggtaccc ggggatcctc tagagtcgac ctgcaggcat gcaagcttgg cgtaatcatg 360
 gtcataagctg tttcctgtgt gaaattgtta tccgctcaca attccacaca acatacgagc 420
 cggaagcata aagtgtaaag cctgggtgtg ctaatgagtg agctaactca cattaattgc 480
 gttgcgctca ctgcccgtt tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat 540
 cggccaacgc gaattcccga cagtaagacg ggtaaagcctg ttgatgatac cgctgcctta 600
 ctgggtgcat tagccagctc gaatgacctg tcacgggata atccgaagtg gtcagactgg 660
 aaaatcagag ggcagggaact gctgaacagc aaaaagtcag atagcaccac atagcagacc 720
 cgccataaaa cgccctgaga agccctgtac gggcttttct tgtattatgg gtagtttctt 780
 tgcattgaatc cataaaaggc gcctgtagt ccatcttacc ccattcactg ccagagccgt 840
 gagcgcagcg aactgaatgt caccgaaaag acagcgactc aggtgcctga tggtcggaga 900
 caaaaggaat attcagcgat ttgcccagc ttgagagggt gctacttaag cctttagggt 960
 ttttaaggctc gttttgtaga ggagcaaaac gcgtttgcga catccttttg taatactgcg 1020
 gaactgacta aagttagtgag ttatacacag ggctgggac tattcttttt atcttttttt 1080
 attctttctt tattctataa attataacca ctggaatata aacaaaaaaa acacacaaag 1140
 gtctagcggg atttacagag ggtctagcag aatttacaag ttttcagca aaggtctagc 1200
 agaattttaca gatacccaca actcaaagga aaaggactag taattatcat tgactagccc 1260
 atctcaattg gtatagtgat taaaatcacc tagaccaatt gagatgtatg tctgaattag 1320
 ttgttttcaa agcaaatgaa ctacgatta gtcgctatga cttaacggag catgaaacca 1380
 agctaatttt atgctgtgtg gcaactacta accccacgat tgaaaaccct acaaggaaaag 1440
 aacggacggt atcgttcact tataaccaat acgctcagat gatgaacatc agtagggaaa 1500
 atgcttatgg tgtattagct aaagcaacca gagagctgat gacgagaact gtggaaatca 1560
 ggaatccttt ggttaaaggc tttgagatt tccagtggaac aaactatgcc aagttctcaa 1620
 gcgaaaaatt agaattagtt tttagtgaag agatattgcc ttatcttttc cagttaaaaa 1680
 aattcataaa atataatctg gaacatgtta agtcttttga aaacaaatc tctatgagga 1740
 tttatgagtg gttattaaaa gaactaacac aaaagaaaac tcacaaggca aatatagaga 1800
 ttagccttga tgaatttaag ttcatgttaa tgcttgaaaa taactaccat gagtttaaaa 1860
 ggcttaacca atgggttttg aaaccaataa gtaaaagattt aaacacttac agcaatatga 1920
 aattgggtgg tgaataagcga ggccgcccga ctgatacgtt gattttccaa gttgaactag 1980
 atagacaaat ggatctcgta accgaacttg agaacaacca gataaaaatg aatggtgaca 2040
 aaataccaac aaccattaca tcagattcct acctacataa cggactaaga aaacactac 2100
 acgatgcttt aactgcaaaa attcagctca ccagttttga ggcaaaaatt ttgagtga 2160
 tgcaaaagtaa gtatgatctc aatgggtcgt tctcatggct caccgaaaaa caacgaacca 2220
 cactagagaa catactggct aaatacggaa ggatctgagg ttcttatggc tcttgtatct 2280
 atcagtgaag catcaagact aacaaacaaa agtagaacia ctgttcaccg ttacatatca 2340
 aagggaaaaac tgtccatag caccagatgaa aacgggtgtaa aaaagataga tacatcagag 2400
 cttttacgag tttttggtgc attcaaagct gttcaccatg aacagatcga caatgtaaca 2460
 gtagaacagc atgtaacacc taatagaaca ggtgaaacca gtaaaacaaa gcaactagaa 2520

```

catgaaattg aacacctgag acaacttgtt acagctcaac agtcacacat agacagcctg 2580
aaacaggcga tgctgcttat cgaatcaaag ctgccgacaa cacgggagcc agtgacgcct 2640
cccgtgggga aaaaatcatg gcaattctgg aagaaatagc gctttcagcc ggcaaaccgg 2700
ctgaagccgg atctgcgatt ctgataacaa actagcaaca ccagaacagc ccgtttgcgg 2760
gcagcaaaac ccgtgggaat taattcccct gctcgcgag gctgggtgcc aagctctcgg 2820
gtaacatcaa ggcccgatcc ttggagccct tgccctcccg cacgatgatc gtgccgtgat 2880
cgaaatccag atccttgacc cgagttgca aacctcact gatccgatg cccgttccat 2940
acagaagctg ggcgaacaaa cgatgctcgc cttccagaaa accgaggatg cgaaccactt 3000
catccggggg cagcaccacc ggcaagcgcc ggcagggcag atccgtgcac agcaccttgc cgtagaagaa cagcaaggcc gccaatgcct 3120
gacgatgcgt ggagaccgaa accttgcgct cgttcgccag ccaggacaga aatgcctcga 3180
cttcgctgct gcccaagggt gccgggtgac gcacaccgtg gaaacggatg aaggcacgaa 3240
cccagtggac ataagcctgt tcggttcgta agctgtaatg caagtagcgt atgcgtcac 3300
gcaactggtc cagaaccttg accgaacgca gcggtggtaa cggcgcatg gcggttttca 3360
tggtttgtta tgactgtttt tttgggttac agtctatgcc tcgggcatcc aagcagcaag 3420
cgcgttatcg cgtgggtcga tgtttgatgt tatggagcag caacgatgtt acgcagcagg 3480
gcagtcgccc taaaacaaaag ttaaacatca tgagggaagc ggtgatcgcc gaagtatcga 3540
ctcaactatc agaggtagtt ggcgtcatcg agcgccatct cgaaccgacg attgatttgc 3600
tacatttgta cggctccgca gtggatggcg gctgaagcc acacagtgat attgatttgc 3660
tggttacggt gaccgttaagg cttgatgaaa caacgcggcg agctttgatc aacgaccttt 3720
tggaacttcc ggcttcccct ggagagagcg agattctccg cgctgtagaa gtcaccattg 3780
ttgtgcacga cgacatcatt ccgtggcggt atccagctaa gcgcgaactg caatttggag 3840
aatggcagcg caatgacatt cttgcaggta tcttcgagcc agccacgatc gacattgatc 3900
tggttatctt gctgacaaaa gcaagagaac atagcgttgc cttggtagggt ccagcgccgg 3960
aggaactctt tgatccggtt cctgaacagg atctatttga ggcgctaaat gaaaccttaa 4020
cgctatggaa ctgcgcgccc gactgggctg gcgatgagcg aaatgtagt cttacgttgt 4080
cccgcatttg gtacagcgca gtaaccggca aaatcgcgcc gaaggatgtc gctgccgact 4140
gggcaatgga ggcctgcgg ccccagatc agcccgatc acttgaagct agacaggctt 4200
atcttgaca agaagaagat cgcttggcct cgcgcgaga tcagttggaa gaatttgc 4260
actacgtgaa aggcgagatc accaaggtag tcggcaata atgtctaaca attcgttcaa 4320
gccgacgcgg cttcgcgcg cggttaact caagcgttag atgcactaag cacataattg 4380
ctcacagcca aactatcagg tcaagctcgc ttttattatt ttaagcgtg cataataagc 4440
cctacacaaa ttgggagata tatcatgaaa ggctggcttt ttcttgttat cgcaatagtt 4500
ggcgaagtaa tcgcaacatc cgcattaaaa tctagcgagg gctttacta 4549

```

<210> 42
 <211> 199
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: glucose isomerase promoter

<220>
 <223> promoter

```

<400> 42
gaattcacta gtcgatctgt gctgtttgcc acggtatgca gcaccagcgc gagattatgg 60
gctcgcacgc tcgactgtcg gacgggggca ctggaacgag aagtcaggcg agccgtcacg 120
cccttgacaa tgccacatcc tgagcaaaata attcaaccac taaacaaatc aaccgcgttt 180
cccggaggta accaagctt

```

<210> 43
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
 <223> primer

<400> 43
 gacgcaacag tattccgtcg c 21

 <210> 44
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <220>
 <223> primer

 <400> 44
 atgagctatc gtatgttccg ccaggcattc tgagtgttaa cg 42

 <210> 45
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <220>
 <223> primer

 <400> 45
 gcctggcgga acatacgata gctcataata tac 33

 <210> 46
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <220>
 <223> primer

 <400> 46
 cggggcgctg ggccagtact g 21

 <210> 47
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <220>
 <223> primer

 <220>
 <223> primer

 <400> 47
 tcaaaccggg tggtttctcg cgaccggg 28

 <210> 48
 <211> 28

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <220>
 <223> primer

 <400> 48
 ctcagccgga tatcgacggc gcgctggg 28

 <210> 49
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <220>
 <223> primer

 <400> 49
 accagcggc cgtcgatata cggctgagta ctcaacacct gccagctctt tacgcagggt 60

 <210> 50
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <220>
 <223> primer

 <400> 50
 cagcatgcct gcgaaccaca ggcctatc 28

 <210> 51
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <220>
 <223> primer

 <400> 51
 atgaacaagt ggggcgtagg gttaacat 28

 <210> 52
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <220>
 <223> primer

<400> 52
ttaaattactt gatttattgt cggcttta

28

<210> 53
<211> 1380
<212> DNA
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 53
ctttaatttt cttttatctt actctcctac ataagacatc aagaacaat tgtatatattgt 60
acaccccccc cctccacaaa cacaatatatt gataatataa agatgtctgc tgctgctgat 120
agattaaact taacttccgg ccacttgaat gctggtagaa agagaagttc ctcttctggt 180
tctttgaagg ctgccgaaaa gcctttcaag gttactgtga ttggatctgg taactggggt 240
actactattg ccaagggtgt tgccgaaaat tgtaagggat acccagaagt ttctgctoca 300
atagtacaaa tgtgggtgtt cgaagaagag atcaatggtg aaaaattgac tgaaatcata 360
aatactagac atcaaaacgt gaaatacttg cctggcatca ctctaccoga caatttgggt 420
gctaattccag acttgattga ttcagtcaag gatgtcgaca tcatcgtttt caacattcca 480
catcaatttt tgccccgtat ctgtagccaa ttgaaagggtc atgttgattc acacgtcaga 540
gctatctcct gtctaaagggt ttttgaagtt ggtgctaaag gtgtccaatt gctatcctct 600
tacatcactg aggaactagg tattcaatgt ggtgctctat ctggtgctaa cattgccacc 660
gaagtcgctc aagaacactg gtctgaaaca acagttgctt accacattcc aaaggatttc 720
agaggcgagg gcaaggacgt cgaccataag gttctaaagg ccttgttcca cagaccttac 780
ttccacgtta gtgtcatcga agatgttgct ggtatctcca tctgtggtgc ttgagaagac 840
gttggtgctc taggttggtg tttcgtcgaa ggtctaggct ggggtaacaa cgcttctgct 900
gccatccaaa gactcgggtt gggtagagatc atcagattcg gtcaaatgtt ttccccagaa 960
tctagagaag aaacatacta ccaagagtct gctggtgttg ctgatttgat caccacctgc 1020
gctggtggtg gaaacgtcaa gggttgctagg ctaatggcta ctcttggtta ggacgcctgg 1080
gaatgtgaaa aggagttggt gaatggccaa tccgctcaag gtttaattac ctgcaagaa 1140
gttcacgaat ggttggaac atgtggctct gtcgaagact tccattatt tgaagccgta 1200
taccaaatcg tttaacaaa ctacccaatg aagaacctgc cggacatgat tgaagaatta 1260
gatctacatg aagattagat ttattggaga aagataacat atcatacttc cccactttt 1320
ttcaggctc ttctatatca tattcataaa ttagcattat gtcatttctc ataactactt 1380

<210> 54
<211> 391
<212> PRT
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 54
Met Ser Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15
Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30
Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr
35 40 45
Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
50 55 60
Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
65 70 75 80
Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
85 90 95
Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile
100 105 110
Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln
115 120 125

Phe Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His
 130 135 140
 Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly
 145 150 155 160
 Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys
 165 170 175
 Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Ile Ala Thr Glu Val Ala Gln Glu His
 180 185 190
 Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly
 195 200 205
 Glu Gly Lys Asp Val Asp His Lys Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg
 210 215 220
 Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile
 225 230 235 240
 Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu
 245 250 255
 Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly
 260 265 270
 Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg
 275 280 285
 Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
 290 295 300
 Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
 305 310 315 320
 Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
 325 330 335
 Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
 340 345 350
 Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
 355 360 365
 Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
 370 375 380
 Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
 385 390
 <210> 55
 <211> 753
 <212> DNA
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
 <400> 55
 atgggattga ctactaaacc tctatctttg aaagttaacg ccgctttgtt cgacgtcgac 60
 ggtaccatta tcatctctca accagccatt gctgcattct ggagggattt cggtaaggac 120
 aaaccttatt tcgatgctga acacgttatc caagtctcgc atggttgag aacgtttgat 180
 gccattgcta agttcgctcc agactttgcc aatgaagagt atgttaacaa attagaagct 240
 gaaattccgg tcaagtacgg tgaaaaatcc attgaagtcc caggtgcagt taagctgtgc 300
 aacgctttga acgctctacc aaaagagaaa tgggctgtgg caacttccgg taccgtgat 360
 atggcacaaa aatggttcga gcctctggga atcaggagac caaagtactt cattaccgct 420

```

aatgatgtca aacagggttaa gcctcatcca gaaccatata tgaagggcag gaatggctta 480
ggatatccga tcaatgagca agacccttcc aaatctaagg tagtagtatt tgaagacgct 540
ccagcaggta ttgccgcccgg aaaaagccgcc gggttgtaaga tcattgggtat tgccactact 600
ttcgacttgg acttcctaaa ggaaaaaggc tgtgacatca ttgtcaaaaa ccacgaatcc 660
atcagagtgg gcggctacaa tgccgaaaca gacgaagttg aattcatttt tgacgactac 720
ttatatgcta aggacgatct gttgaaatgg taa 753

```

```

<210> 56
<211> 250
<212> PRT
<213> Saccharomyces cerevisiae

```

```

<400> 56
Met Gly Leu Thr Thr Lys Pro Leu Ser Leu Lys Val Asn Ala Ala Leu
  1          5          10          15

Phe Asp Val Asp Gly Thr Ile Ile Ile Ser Gln Pro Ala Ile Ala Ala
  20          25          30

Phe Trp Arg Asp Phe Gly Lys Asp Lys Pro Tyr Phe Asp Ala Glu His
  35          40          45

Val Ile Gln Val Ser His Gly Trp Arg Thr Phe Asp Ala Ile Ala Lys
  50          55          60

Phe Ala Pro Asp Phe Ala Asn Glu Glu Tyr Val Asn Lys Leu Glu Ala
  65          70          75          80

Glu Ile Pro Val Lys Tyr Gly Glu Lys Ser Ile Glu Val Pro Gly Ala
  85          90          95

Val Lys Leu Cys Asn Ala Leu Asn Ala Leu Pro Lys Glu Lys Trp Ala
 100          105          110

Val Ala Thr Ser Gly Thr Arg Asp Met Ala Gln Lys Trp Phe Glu His
 115          120          125

Leu Gly Ile Arg Arg Pro Lys Tyr Phe Ile Thr Ala Asn Asp Val Lys
 130          135          140

Gln Gly Lys Pro His Pro Glu Pro Tyr Leu Lys Gly Arg Asn Gly Leu
 145          150          155          160

Gly Tyr Pro Ile Asn Glu Gln Asp Pro Ser Lys Ser Lys Val Val Val
 165          170          175

Phe Glu Asp Ala Pro Ala Gly Ile Ala Ala Gly Lys Ala Ala Gly Cys
 180          185          190

Lys Ile Ile Gly Ile Ala Thr Thr Phe Asp Leu Asp Phe Leu Lys Glu
 195          200          205

Lys Gly Cys Asp Ile Ile Val Lys Asn His Glu Ser Ile Arg Val Gly
 210          215          220

Gly Tyr Asn Ala Glu Thr Asp Glu Val Glu Phe Ile Phe Asp Asp Tyr
 225          230          235          240

Leu Tyr Ala Lys Asp Asp Leu Leu Lys Trp
 245          250

```

```

<210> 57
<211> 387

```

<212> PRT

<213> E. coli

<400> 57

```

Met Asn Asn Phe Asn Leu His Thr Pro Thr Arg Ile Leu Phe Gly Lys
 1           5           10           15
Gly Ala Ile Ala Gly Leu Arg Glu Gln Ile Pro His Asp Ala Arg Val
          20           25           30
Leu Ile Thr Tyr Gly Gly Gly Ser Val Lys Lys Thr Gly Val Leu Asp
          35           40           45
Gln Val Leu Asp Ala Leu Lys Gly Met Asp Val Leu Glu Phe Gly Gly
          50           55           60
Ile Glu Pro Asn Pro Ala Tyr Glu Thr Leu Met Asn Ala Val Lys Leu
          65           70           75           80
Val Arg Glu Gln Lys Val Thr Phe Leu Leu Ala Val Gly Gly Gly Ser
          85           90           95
Val Leu Asp Gly Thr Lys Phe Ile Ala Ala Ala Ala Asn Tyr Pro Glu
          100          105          110
Asn Ile Asp Pro Trp His Ile Leu Gln Thr Gly Gly Lys Glu Ile Lys
          115          120          125
Ser Ala Ile Pro Met Gly Cys Val Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gly Ser
          130          135          140
Glu Ser Asn Ala Gly Ala Val Ile Ser Arg Lys Thr Thr Gly Asp Lys
          145          150          155          160
Gln Ala Phe His Ser Ala His Val Gln Pro Val Phe Ala Val Leu Asp
          165          170          175
Pro Val Tyr Thr Tyr Thr Leu Pro Pro Arg Gln Val Ala Asn Gly Val
          180          185          190
Val Asp Ala Phe Val His Thr Val Glu Gln Tyr Val Thr Lys Pro Val
          195          200          205
Asp Ala Lys Ile Gln Asp Arg Phe Ala Glu Gly Ile Leu Leu Thr Leu
          210          215          220
Ile Glu Asp Gly Pro Lys Ala Leu Lys Glu Pro Glu Asn Tyr Asp Val
          225          230          235          240
Arg Ala Asn Val Met Trp Ala Ala Thr Gln Ala Leu Asn Gly Leu Ile
          245          250          255
Gly Ala Gly Val Pro Gln Asp Trp Ala Thr His Met Leu Gly His Glu
          260          265          270
Leu Thr Ala Met His Gly Leu Asp His Ala Gln Thr Leu Ala Ile Val
          275          280          285
Leu Pro Ala Leu Trp Asn Glu Lys Arg Asp Thr Lys Arg Ala Lys Leu
          290          295          300
Leu Gln Tyr Ala Glu Arg Val Trp Asn Ile Thr Glu Gly Ser Asp Asp
          305          310          315          320

```


Glu Arg Ile Asp Ala Ala Ile Ala Ala Thr Arg Asn Phe Phe Glu Gln
 325 330 335
 Leu Gly Val Pro Thr His Leu Ser Asp Tyr Gly Leu Asp Gly Ser Ser
 340 345 350
 Ile Pro Ala Leu Leu Lys Lys Leu Glu Glu His Gly Met Thr Gln Leu
 355 360 365
 Gly Glu Asn His Asp Ile Thr Leu Asp Val Ser Arg Arg Ile Tyr Glu
 370 375 380
 Ala Ala Arg
 385

<210> 58
 <211> 1164
 <212> DNA
 <213> E. coli

<400> 58
 atgaacaact ttaatctgca caccocaacc cgcattctgt ttggtaaagg cgcaatcgct 60
 ggtttacgcg aacaaattcc tcacgatgct cgcgtattga ttacctacgg cggcggcagc 120
 gtgaaaaaaa ccggcggttct cgatcaagtt ctggatgccc tgaaaggcat ggacgtgctg 180
 gaatttggcg gtattgagcc aaaccgggt tatgaaacgc tgatgaacgc cgtgaaactg 240
 gttcgcgaac agaaagtgc tttcctgctg cgggttggcg cgggttctgt actggacggc 300
 accaaattta tcgcgcgagc ggctaactat ccggaataaata tcgatccgtg gcacattctg 360
 caaacgggcg gtaaagagat taaaagcgcc atcccgatgg gctgtgtgct gacgctgcca 420
 gcaaccgggt cagaatccaa cgcaggcgcg gtgatctccc gtaaaaccac aggcgcacaag 480
 caggcggttcc attctgccc a tttcagccg gtatttgccg tgctcgatcc ggtttatacc 540
 tacaccctgc cgcgcgtca ggtggctaac ggcgtagtgg acgcctttgt acacaccgtg 600
 gaacagtatg ttaccaaacc ggttgatgcc aaaattcagg accgtttcgc agaaggcatt 660
 ttgctgacgc taatcgaaga tgggtccgaaa gccctgaaag agccagaaaa ctacgatgtg 720
 cgcgcccaacg tcatgtgggc ggcgactcag gcgctgaacg gtttgattgg cgctggcgta 780
 ccgcaggact gggcaacgca tatgctgggc cagcaactga ctgcgatgca cggctctggat 840
 caccgcgcaa cactggctat cgtcctgcct gcactgtgga atgaaaaacg cgataccaag 900
 cgcgctaagc tgctgcaata tgctgaacgc gtctggaaca tcaactgaagg ttccgatgat 960
 gagcgtattg acgcccgcgt tgccgcaacc cgcaatttct ttgagcaatt aggcgtgccc 1020
 acccaacctc ccgactacgg tctggacggc agctccatcc cggctttgct gaaaaaactg 1080
 gaagagcagc gcatgaccca actggcgcaa aatcatgaca ttacgttgga tgtcagccgc 1140
 cgtatatacg aagccgcccc ctaa 1164

<210> 59
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 59
 gcggtaccgt tgctcgacgc tcaggttttc gg 32

<210> 60
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 60
 gcgagctcga cgcttgccct gatcgagttt tgc 33

<210> 61
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 61
 gcgagctcga cgcttgccct gatcgagttt tgc 33

<210> 62
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 62
 cagctggcaa ttccggttcg 20

<210> 63
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 63
 cccagctggc aattccggtt cgcttgctgt 30

<210> 64
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 64
 ggcgacccga cgctccagac ggaagctggt 30

<210> 65
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 65
 ccgcaagatt cacggatgca tcgtgaaggg 30

<210> 66
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 66
 cgccttcttg acgagttctg agcggga 27

<210> 67
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 67
 ggaattcatg aacaacttta atctgcacac 30

<210> 68
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 68
 gtttgaggcg taaaaagctt agcgggaggc 30

【図面の簡単な説明】

【図1】

d h a レギュロンサブクローン p H K 2 8 - 2 6 の配列内の遺伝子体制。

【図2】

本質的に実施例7に記載するビタミンB₁₂の一定の供給を用いた2つの発酵実験の間で比較される細胞外可溶性タンパク質 (g/L) のグラフ。

【図3】

本質的に実施例7に記載するビタミンB₁₂の一定の供給を用いた2つの発酵実験の間で比較される細胞生存率 [(生存細胞/mL) / OD 550] のグラフ。

【図4】

本質的に実施例7に記載する、しかしビタミンB₁₂ 又は補酵素B₁₂ の不在下における2つの発酵実験の間で比較されるグルコースからのグリセロールの収率のグラフ。

【図5】

1, 3-プロパンジオールへのグルコースの代謝的転換を示す流れ図。

【図6】

未変性ゲル上の内因性E. コリオキシドレダクターゼ活性（非一特異的触媒活性）を示すバンドから抽出される可溶性タンパク質画分を用いた2D-PAGE膜プロット。

【图1】

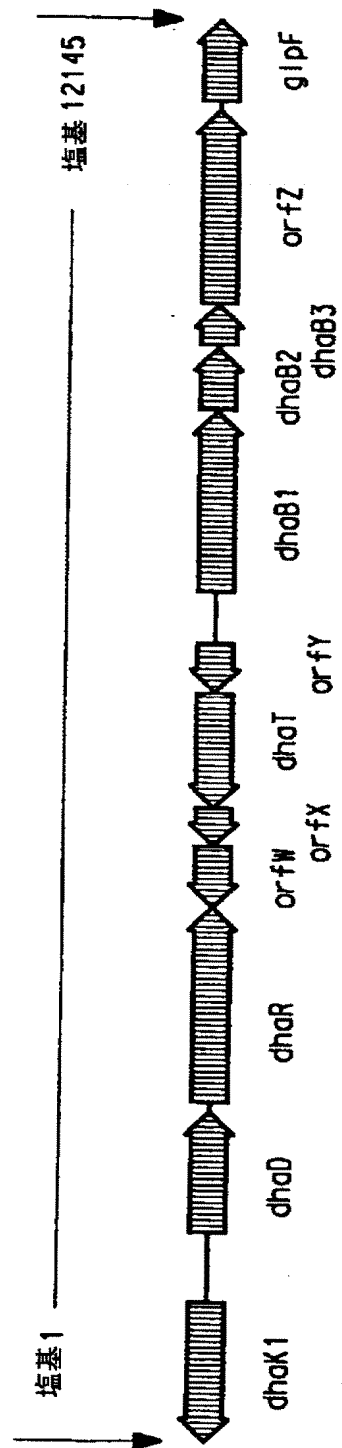
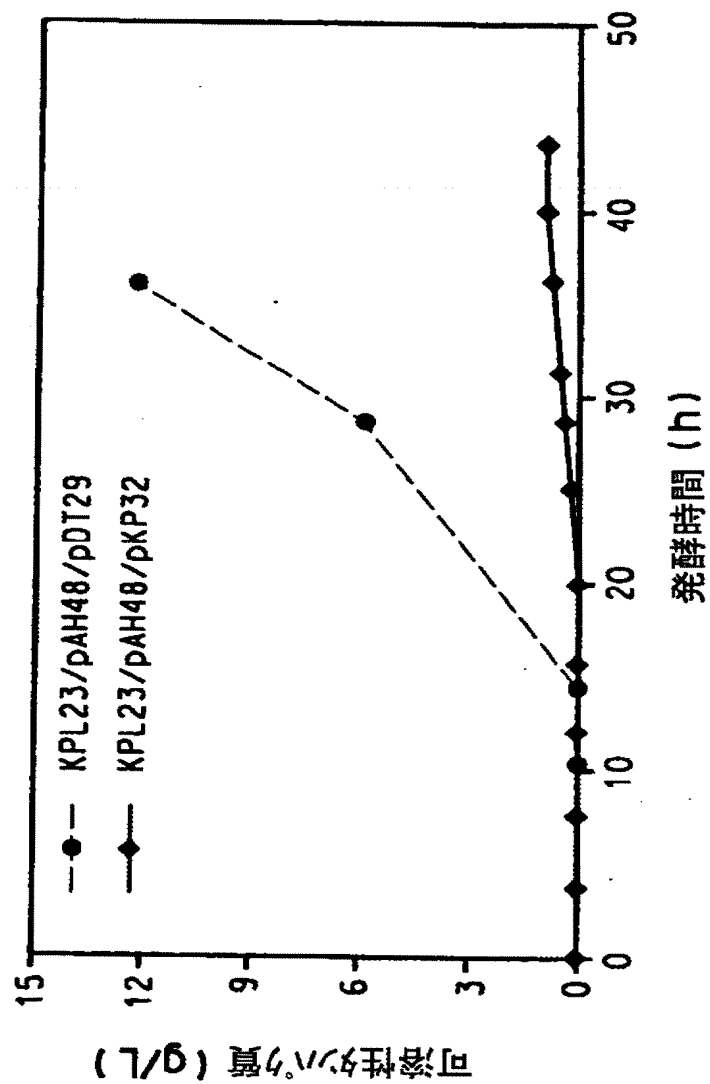


FIG. 1

【図 2】



発酵時間 (h)	KPL23/pAH48/pDT29 (g/L)	KPL23/pAH48/pKP32 (g/L)
0	0.0	0.0
5	0.0	0.0
10	0.0	0.0
15	0.0	0.0
20	0.5	0.0
25	1.0	0.0
30	1.5	0.0
35	12.5	0.0
40	12.5	0.0
45	12.5	0.0
50	12.5	1.5

【図3】

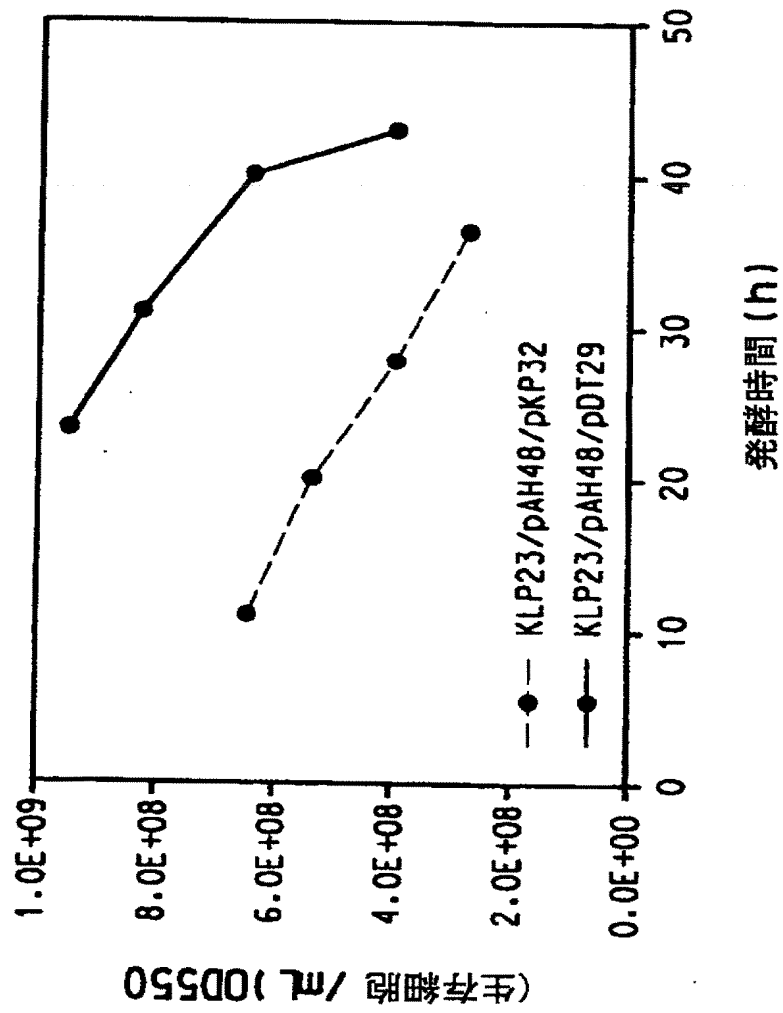


FIG. 3

【図4】

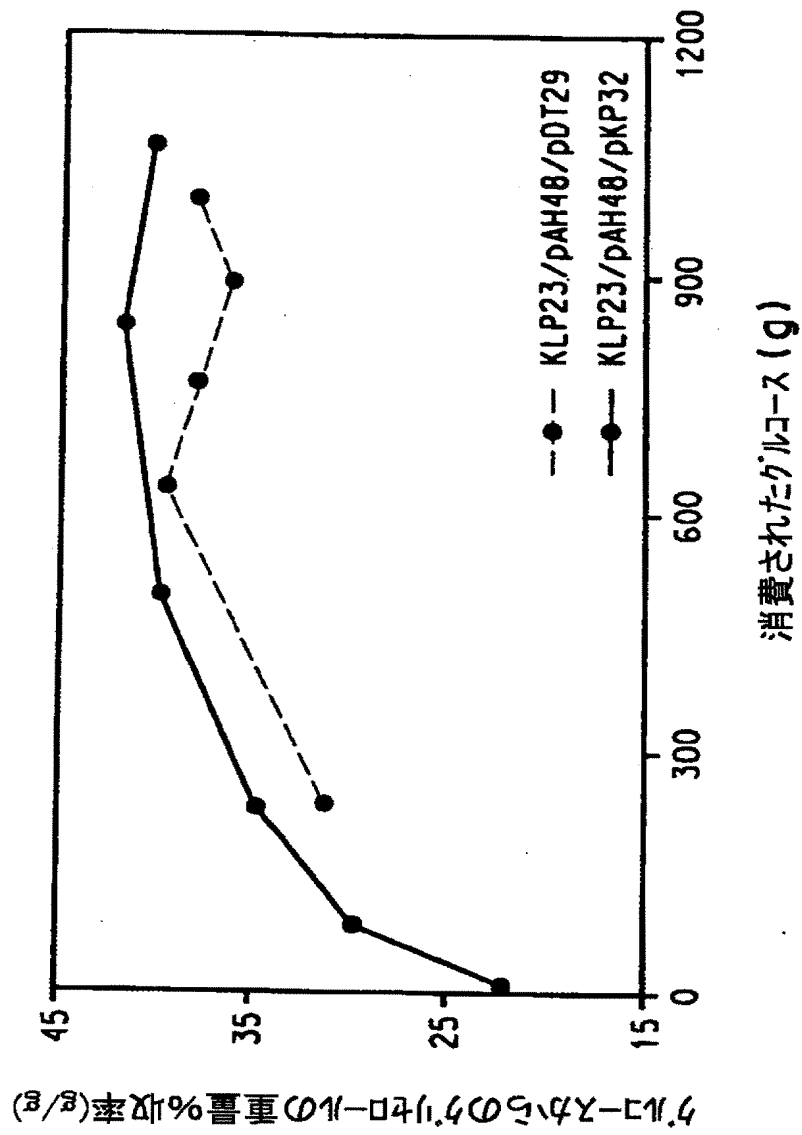


FIG. 4

【図5】

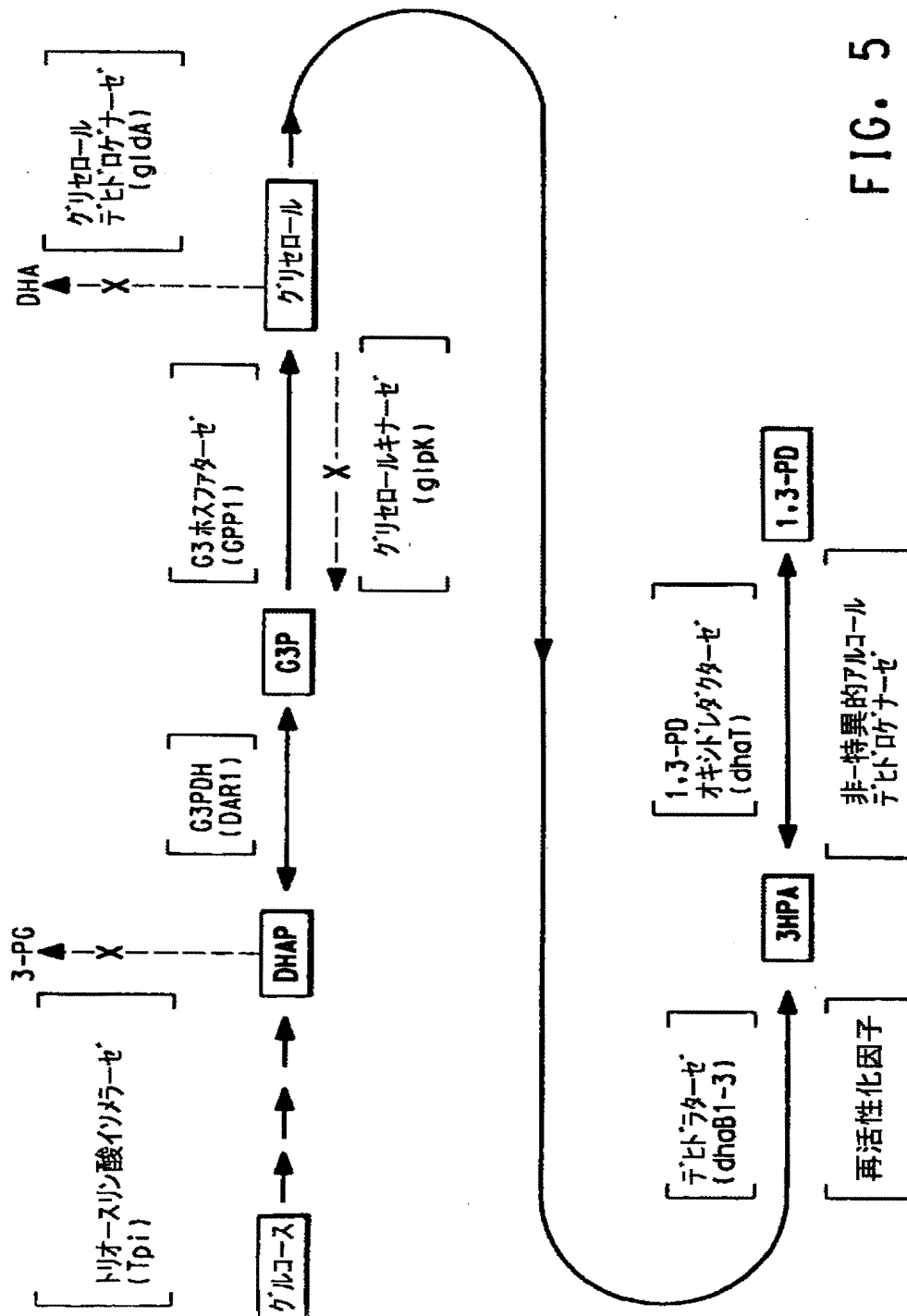


FIG. 5

【図6】



FIG. 6

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 00/22874

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/52 C12N15/70 C12P7/18 C12N9/04 C12N1/21 //(C12N1/21,C12R1:19)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
EPO-Internal, EMBL, BIOSIS, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! Accession AE000383, 29 January 1997 (1997-01-29) BLATTNER F R ET AL: "Escherichia coli K-12 MG1655 section 273 of 400 of the complete genome." XP002162541 100% identity in a 1164 BP overlap between SEQ ID NO 58 (full length) and positions 5818-6981 of AE000383. The predicted amino acid sequences are identical. --- -/--	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
9 March 2001		22/03/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 apo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Lejeune, R

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 00/22874

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BOUVET O M M ET AL: "Taxonomic diversity of anaerobic glycerol dissimilation in the Enterobacteriaceae." RESEARCH IN MICROBIOLOGY, vol. 146, no. 4, 1995, pages 279-290, XP000982719 ISSN: 0923-2508 the whole document	
A	SKRALY F A ET AL: "Construction and characterization of a 1,3-propanediol operon" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, US, WASHINGTON, DC, vol. 64, no. 1, January 1998 (1998-01), pages 98-105, XP002134649 ISSN: 0099-2240 the whole document	
X	WO 98 21341 A (DIAZ TORRES MARIA ;CHASE MATTHEW W (US); GENECOR INT (US); TRIMBU) 22 May 1998 (1998-05-22) cited in the application examples 1-10 figure 1	25
Y	WO 99 28480 A (DU PONT ;NAIR RAMESH V (US); GENECOR INT INC (US); PAYNE MARK S (U) 10 June 1999 (1999-06-10) cited in the application abstract	28
Y	WO 98 21339 A (DIAS TORRES MARIA ;HAYNIE SHARON LORETTA (US); HSU AMY KUANG HUA () 22 May 1998 (1998-05-22) cited in the application examples 1,2 page 23 page 27	28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Jonal Application No

PCT/US 00/22874

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9821341 A	22-05-1998	AU 5248498 A	03-06-1998
		AU 5507698 A	03-06-1998
		BR 9712761 A	26-10-1999
		CN 1239511 A	22-12-1999
		CN 1244217 A	09-02-2000
		EP 0942989 A	22-09-1999
		EP 0946732 A	06-10-1999
		WO 9821339 A	22-05-1998
		US 6013494 A	11-01-2000
		US 6136576 A	24-10-2000
		ZA 9710194 A	12-05-1999
WO 9928480 A	10-06-1999	AU 1619199 A	16-06-1999
		BR 9815361 A	21-11-2000
		CN 1284132 T	14-02-2001
		EP 1034278 A	13-09-2000
WO 9821339 A	22-05-1998	AU 5248498 A	03-06-1998
		AU 5507698 A	03-06-1998
		BR 9712761 A	26-10-1999
		CN 1239511 A	22-12-1999
		CN 1244217 A	09-02-2000
		EP 0942989 A	22-09-1999
		EP 0946732 A	06-10-1999
		WO 9821341 A	22-05-1998
		US 6013494 A	11-01-2000
		US 6136576 A	24-10-2000
		ZA 9710194 A	12-05-1999

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 1 2 P 7/18		C 1 2 R 1:19	
/(C 1 2 N 1/21		1:01	
C 1 2 R 1:19)		C 1 2 R 1:145	
(C 1 2 N 9/04		1:225	
C 1 2 R 1:01)		C 1 2 R 1:66	
(C 1 2 N 9/04		1:85	
C 1 2 R 1:145)		C 1 2 R 1:645	
(C 1 2 N 9/04		1:84	
C 1 2 R 1:225)		C 1 2 R 1:72	
(C 1 2 N 9/04		1:78	
C 1 2 R 1:66)		C 1 2 R 1:785	
(C 1 2 N 9/04		1:88	
C 1 2 R 1:85)		C 1 2 R 1:07	
(C 1 2 N 9/04		1:42	
C 1 2 R 1:645)		C 1 2 R 1:465	
(C 1 2 P 7/18		1:38	
C 1 2 R 1:66)		C 1 2 N 15/00	Z N A A
(C 1 2 N 9/04			
C 1 2 R 1:72)			
(C 1 2 N 9/04			
C 1 2 R 1:78)			
(C 1 2 N 9/04			
C 1 2 R 1:785)			
(C 1 2 N 9/04			
C 1 2 R 1:88)			
(C 1 2 N 9/04			
C 1 2 R 1:07)			
(C 1 2 N 9/04			
C 1 2 R 1:42)			
(C 1 2 N 9/04			
C 1 2 R 1:465)			
(C 1 2 N 9/04			
C 1 2 R 1:38)			
(C 1 2 N 9/04			
C 1 2 R 1:19)			
(C 1 2 P 7/18			
C 1 2 R 1:85)			
(C 1 2 P 7/18			
C 1 2 R 1:19)			
(C 1 2 P 7/18			
C 1 2 R 1:145)			
(C 1 2 P 7/18			
C 1 2 R 1:225)			
(C 1 2 P 7/18			
C 1 2 R 1:66)			
(C 1 2 P 7/18			

- C 1 2 R 1:85)
 (C 1 2 P 7/18
 C 1 2 R 1:645)
 (C 1 2 P 7/18
 C 1 2 R 1:84)
 (C 1 2 P 7/18
 C 1 2 R 1:72)
 (C 1 2 P 7/18
 C 1 2 R 1:78)
 (C 1 2 P 7/18
 C 1 2 R 1:785)
 (C 1 2 P 7/18
 C 1 2 R 1:88)
 (C 1 2 P 7/18
 C 1 2 R 1:07)
 (C 1 2 P 7/18
 C 1 2 R 1:465)
 (C 1 2 P 7/18
 C 1 2 R 1:38)
 (72)発明者 エンプテージ, マーク
 アメリカ合衆国デラウェア州19810ウスル
 ミントン・ランドンドライブ2822
 (72)発明者 ハイニエ, シヤロン
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州19106フ
 イラデルフィア・スプルウストリート529
 (72)発明者 ラフエンド, ライザ
 アメリカ合衆国デラウェア州19703クレイ
 モント・マウントバーノンドライブ 2
 (72)発明者 プシイ, ジエフ
 アメリカ合衆国カリフォルニア州94303パ
 ロアルト・ページミルロード925
 (72)発明者 ホワイテツド, グレッグ
 アメリカ合衆国カリフォルニア州ベルモン
 ド・サウスロード304
 F ターム(参考) 4B024 BA08 BA80 CA04 DA06 EA04
 GA11 HA20
 4B050 CC03 DD04 LL05
 4B064 AC05 CA02 CA19 CA21 CC24
 DA16
 4B065 AA01X AA09X AA15X AA23X
 AA26X AA29X AA41X AA46X
 AA50X AA57X AA60X AA72X
 AA73X AA76X AA77X AA79X
 AB01 BA02 BB15 CA05 CA28

【要約の続き】

に改良された方法は、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを1，3-プロパンジオールに転換するのに十分な非-特異的触媒活性をコードする遺伝子がE. コリ中に存在することに頼っている。